

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ANDRÉ GUSTAVO LIMA DE ALMEIDA MARTINS

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DO MANJERICÃO
(*Ocimum basilicum* Linnaeus) E DO GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe)
FRENTE A LINHAGENS DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICAS
ISOLADAS DE HORTALIÇAS

JOÃO PESSOA – PB

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANDRÉ GUSTAVO LIMA DE ALMEIDA MARTINS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DO MANJERICÃO
(*Ocimum basilicum* Linnaeus) E DO GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe)
FRENTE A LINHAGENS DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICAS
ISOLADAS DE HORTALIÇAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal da Paraíba para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

JOÃO PESSOA – PB

2010

M386a Martins, André Gustavo Lima de Almeida.

Atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjericão (*Ocimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças / André Gustavo Lima de Almeida Martins – João Pessoa, 2010.

179f.: il.

Orientador: Antonio Gouveia de Souza
Tese (Doutorado) – UFPB/CT

1. Tecnologia de Alimentos. 2. Óleos essenciais. 3. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). 4. Manjericão (*Ocimum basilicum* Linnaeus). 5. Atividade antibacteriana.

UFPB/BC

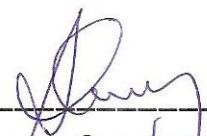
CDU: 664(043)

ANDRÉ GUSTAVO LIMA DE ALMEIDA MARTINS

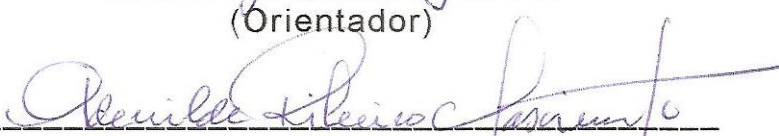
**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DO
MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* Linnaeus) E DO GENGIBRE (*Zingiber
officinale* Roscoe) FRENTE A LINHAGENS DE *Escherichia coli*
ENTEROPATOGÊNICAS ISOLADAS DE HORTALIÇAS**

Tese aprovada em: 05 de Abril de 2010

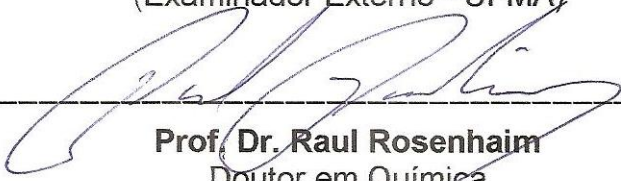
BANCA EXAMINADORA



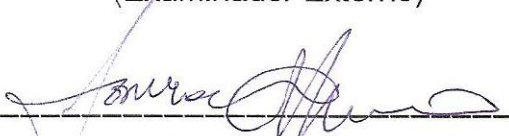
Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza
Doutor em Química - UFPB
(Orientador)



Profa. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento
Doutora em Ciência dos Alimentos
(Examinador Externo - UFMA)



Prof. Dr. Raul Rosenhaim
Doutor em Química
(Examinador Externo)



Prof. Dr. José Marcelino Oliveira Cavaleiro
Doutor em Ecologia e Recursos Naturais
(Examinador Interno - UFPB)



Prof. Dr. João Andrade da Silva
Doutor em Engenharia de Alimentos
(Examinador Interno - UFPB)

*Aos meus pais,
Auricélia Lima de Almeida Martins e Rubens Oliveira Martins,*

O momento que vivo agora é fascinante e só existe porque vocês se doaram em silêncio e aceitaram viver comigo o meu sonho. Presentearam-me com a riqueza do estudo e fizeram de mim não apenas um profissional, mas, sobretudo ser humano. Amados pais, a emoção me deixa sem palavras, ficando a certeza de que hoje lhes dedico esta vitória, como uma forma singela de agradecer, pelo amor, incentivo e por sempre tornar realidade todos os meus sonhos.

A prof^a. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento

e

Ao prof. Dr. João Elias Mouchrek Filho

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis. A vocês, o meu respeito, amizade, afeto e eterna gratidão.

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de todas as coisas.

Aos meus pais, Auricélia Lima de Almeida Martins e Rubens Oliveira Martins pelos seus ensinamentos, por me compreenderem e me apoiarem, incondicionalmente, em todas as circunstâncias. Aos meus irmãos Alan, Alex e Rubens Júnior pelo o apoio e incentivo.

Ao professor Dr. Antonio Gouveia de Souza, por ter aceito me orientar e tornar possível a realização deste trabalho.

À professora Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento pela disponibilização dos laboratórios de microbiologia do Programa de Controle de Qualidade de Alimentos e Água da Universidade Federal do Maranhão (PCQA/UFMA) e por todos os meios de cultura, equipamentos e demais recursos, sem os quais, a realização da parte experimental desta pesquisa seria inviável. Agradeço ainda, por sua orientação, amizade, dedicação e profissionalismo.

Aos professores, Dr. João Elias Mouchrek Filho (UFMA), Dr. Víctor Mouchrek Filho (UFMA), Dr. Nestor Everton Mendes Filho (UFMA), Dr. Armando Barbosa Bayma (UFMA), Dra. Vera Lúcia Dias Neves (UEMA), Dr. Manacés Cunha e ao Dr. Silvio Carvalho Marinho pelo apoio, incentivo e, sobretudo pela amizade.

A todos os amigos e colegas de profissão que fazem parte da equipe do Laboratório de Microbiologia do Programa de Controle Qualidade de Alimentos e Água do Pavilhão Tecnológico (PCQA/UFMA), Josilene Lima Serra, Francisca das Chagas Costa Oliveira, Natanael Eudes Aragão, Liana Souza Andrade, José Ribamar Carvalho Neves, Joze Nascimento, Sra. Maria Raimunda (Dona Dica), Ana Sheila Martins, José Walter e Paula Coelho Everton pela amizade e pela colaboração imprescindível na realização deste trabalho.

Ao prof. MsC. Eurípedes Gomes Oliveira (UFMA) pela valiosa contribuição durante a realização dos experimentos.

Aos meus amigos e irmãos da Universidade Federa da Paraíba, Maria Margareth Rolim Martins Rocha, Juan Carlos Letellier, João Paulo Prado, Vanessa Prado, Elciane Nóbrega e Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo pela verdadeira amizade que nos une desde o primeiro momento.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba em especial ao prof. Dr. José Marcelino Oliveira Cavalheiro, Dr. Heinz Johann Holschuh, Dra. Janeeyre Ferreira Maciel, Dr. Pushkar Singh Bora e ao prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira pelos valiosos conhecimentos que adquiri no decorrer das aulas ministradas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão da bolsa e pelo incentivo à pesquisa no Estado do Maranhão.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para viabilização, desenvolvimento e conclusão desta tese.

Título: Atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjeriço (*Ocimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças.

Autor: André Gustavo Lima de Almeida Martins

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

RESUMO

Considerando-se a crescente participação dos vegetais na transmissão de microrganismos, incluindo as *Escherichia coli* enteropatogênicas multirresistentes às drogas convencionais, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo os óleos essenciais, tem se intensificado. Esta pesquisa objetivou avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjeriço (*Ocimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças cultivadas pelos sistemas orgânico e hidropônico, comercializadas em feiras livres e supermercados na cidade de São Luís/MA, utilizando-se o Método de Difusão em Discos (MDD). Foram analisadas 100 amostras de alfaces da variedade crespa e 60 de agrião. A extração dos óleos essenciais do manjeriço (folhas) e de gengibre (rizoma) foi realizada pelo método de arraste de vapor d'água (hidrodestilação), utilizando o extrator de Clevenger. Além das constantes físico-químicas de densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência, identificaram-se os componentes majoritários de cada óleo essencial pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). Os resultados indicaram que, independente do sistema de cultivo, tanto as amostras de alfaces quanto as de agrião apresentaram contaminação por sorogrupos de *E. coli* EPEC clássica e enterohemorrágica (EHEC). Nas alfaces foram identificados os sorogrupos: O55, O26, O111, O114, O125, O126, O127, O142 (*E. coli* EPEC) e O157 (*E. coli* EHEC) e no agrião, O55, O125, O126 e O127 (*E. coli* EPEC). Com relação à atividade antibacteriana, tanto o óleo essencial do manjeriço quanto o do gengibre demonstraram ação bactericida frente aos sorogrupos de *E. coli* isolados das alfaces e do agrião.

Palavras-chave: Alface. Agrião. *Escherichia coli*. Manjeriço. Gengibre. Atividade antibacteriana.

Title: Antibacterial activity of essential oils of basil (*Ocimum basilicum* Linnaeus) and ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) front the line of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated of grasses.

Author: André Gustavo Lima de Almeida Martins

Mastermind: Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

ABSTRACT

Considering the increase of the involvement of vegetables in the transmission of microorganism include the enteropathogenic *Escherichia coli* multiresistance to conventional drugs, the search for new antimicrobial substances from natural sources, including the essential oils, has been intensive. This study aimed evaluate the antibacterial activity of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linnaeus) and ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) front strains of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from grass cultivated by organic and hydroponic system, sold in street markets and supermarkets of São Luís city – MA, using the Method of Diffusion in Disc (MDD). Were analyzed 100 samples of curly lettuce and 60 of watercress. In this work, carried out the extraction of the essential oils of basil (leafs) and ginger (rhizome) by steam drag along method (hydro-distillation) using a Clevenger system. Besides density, refraction rate, solubility, color and physics appearance constants, the majority compounds were identified of each essential oil by the Gas Chromatography technique docked to Masses Spectrometry (CG-MS). The results showed that, independently the cultivation system, as many the samples of lettuce as the samples of watercress presented contamination by serogroups of *E. coli* classical EPEC and enterohemorrhagic (EHEC). In the lettuces were identified the serogroups: O55, O26, O111, O114, O125, O126, O127, O142 (*E. coli* EPEC) e O157 (*E. coli* EHEC) and in the watercress, O55, O125, O126 e O127 (*E. coli* EPEC). About the antibacterial activity, as the essential oil of basil as the ginger one showed bactericidal action front serougrups of *E. coli* isolated of the lettuces and watercress.

Key-words: Lettuce. Watercress. *Escherichia coli*. Basil. Ginger. Antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização e mecanismo de ação dos componentes dos óleos essenciais sobre alvos na célula bacteriana.	31
Figura 2. Alguns exemplos das características morfológicas de diferentes variedades de manjericão: (A) manjericão de folhas verdes, grandes e linheformes com flores brancas (<i>Ocimum basilicum</i> L. - utilizado na pesquisa); (B) folhas e caule roxos (<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>) (C) folhas verdes, grandes e circulares (<i>Ocimum basilicum</i> Genovence, tipo folha de alface); (D) flores roxas.	34
Figura 3. Estruturas dos principais componentes encontrados no óleo essencial do manjericão.	36
Figura 4. <i>Zingiber officinale</i> Roscoe: vista geral da planta e do rizoma.	38
Figura 5. Algumas estruturas de componentes encontrados no óleo essencial do gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	40
Figura 6. <i>Escherichia coli</i>	41
Figura 7. Infecção das células da mucosa intestinal causada por <i>E. coli</i> EPEC	46
Figura 8. Formação do pedestal produzido durante o processo infeccioso causado por <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	47
Figura 9. Infecção da mucosa intestinal por <i>E. coli</i> ETEC	50
Figura 10. Infecção da mucosa por <i>E. coli</i> EIEC	52
Figura 11. Infecção das células da mucosa intestinal por <i>E. coli</i> EHEC.....	55
Figura 12. Infecção da mucosa intestinal por <i>E. coli</i> EAEC.....	58
Figura 13. Exemplos de padrões de aderência: (A) padrão de aderência localizada, expressa por uma <i>E. coli</i> EPEC; (B) padrão de aderência difusa apresentada por <i>E. coli</i> DAEC.....	61
Figura 14. Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	65
Figura 15. Agrião (<i>Nasturtium officinale</i> R. Br.)	66
Figura 16. Contaminação das hortaliças durante o cultivo	68
Figura 17. Contaminação das hortaliças pós-colheita: (A) higienização; (B) comercialização – supermercados e (C) feiras livres.	69

Figura 18. Características do crescimento de <i>Escherichia coli</i> em Agar Eosina Azul de Metileno.....	72
Figura 19. Características de colônias características de <i>Escherichia coli</i> no Agar MacConkey Sorbitol. (A): sorbitol positiva e (B) sorbitol negativa.	72
Figura 20. Sistema Clevenger – Extrator de óleos essenciais.....	75
Figura 21. Identificação bioquímica da <i>E. coli</i> em sistema API 20E. (A): <i>E. coli</i> enteropatogênica H ₂ S (+) e (B): <i>E. coli</i> típica H ₂ S (-).	81
Figura 22. Produção de H ₂ S por <i>E. coli</i> enteropatogênica em Agar SIM.....	82
Figura 23. Cromatograma do óleo essencial do manjeriço.....	95
Figura 24. Cromatograma do óleo essencial do gengibre	95
Figura 25. Espectro de massas do composto do pico 4 do cromatograma da Figura 23 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas do manjeriço. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa.	96
Figura 26. Espectro de massas do composto do pico 2 do cromatograma da Figura 23 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas do manjeriço. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST 21 do programa.	97
Figura 27. Espectro de massas do composto do pico 5 do cromatograma da Figura 23 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas do manjeriço. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST 107 do programa.	98
Figura 28. Espectro de massas do composto do pico 1 do cromatograma da Figura 23 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas do manjeriço. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca AMDIS do programa.....	99
Figura 29. Espectro de massas do composto do pico 3 do cromatograma da Figura 23 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas do manjeriço. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca AMDIS do programa.....	100
Figura 30. Espectro de massas do composto do pico 16 do cromatograma da Figura 24 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial do	

rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST21 do programa. 101

Figura 31. Espectro de massas do composto do pico 11 do cromatograma da Figura 24 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa. 102

Figura 32. Espectro de massas do composto do pico 17 do cromatograma da Figura 24 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa. 103

Figura 33. Espectro de massas do composto do pico 9 do cromatograma da Figura 24 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST21 do programa. 104

Figura 34. Espectro de massas do composto do pico 18 do cromatograma da Figura 24 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST107 do programa. 105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação quimiotaxonômica do manjeriçao (<i>Ocimum basilicum</i> L.) baseado na origem geográfica	35
Quadro 2. Linhagens patogênicas de <i>E. coli</i>	62
Quadro 3. Características e veículos ou fontes de surtos dos principais grupos de <i>E. coli</i> diarreio gênicas.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Freqüência e percentual de isolamento de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas isoladas das amostras de alfaces e agrião cultivadas pelos sistemas orgânico e hidropônico comercializadas em feiras livres e supermercados da cidade de São Luís/ MA.	84
Tabela 2. Características físico-químicas e percentuais de rendimento dos óleos essenciais do manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> Linn.) e do gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe).....	90
Tabela 3. Principais constituintes do óleo essencial do manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> Linn.)	93
Tabela 4. Principais constituintes do óleo essencial do gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe).....	94
Tabela 5. Características numéricas da atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente à <i>Escherichia coli</i> EPEC isoladas de alfaces cultivadas pelos sistemas orgânico e hidropônico segundo sorogrupos e tamanho do halo de inibição (mm).....	113
Tabela 6. Características numéricas das atividades antibacterianas do óleo essencial do gengibre frente à <i>Escherichia coli</i> EPEC isoladas de alfaces cultivadas pelos sistemas orgânico e hidropônico segundo sorogrupos e tamanho do halo de inibição (mm).....	114
Tabela 7. Características numéricas da atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente à <i>Escherichia coli</i> EPEC isoladas do agrião cultivado pelos sistemas orgânico e hidropônico segundo sorogrupos e tamanho do halo de inibição (mm).....	115
Tabela 8. Características numéricas das atividades antibacterianas do óleo essencial do gengibre frente à <i>Escherichia coli</i> EPEC isoladas do agrião cultivado pelos sistemas orgânico e hidropônico segundo sorogrupos e tamanho do halo de inibição (mm).....	116

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

- AA: Adesão agregativa
- AAF: Fímbria de aderência agregativa de EAEC
- A/E: Fenômeno de ligação e desaparecimento (“Attaching-and-Effacing”)
- AIDA: Adesina plasmidal
- AMIDS: Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System
- AMPc: Adenosina monofosfato cíclica
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BFP: Pilus em forma de feixe (“Bundle-Forming-Pilus”)
- BHI: Caldo Infuso Cérebro Coração
- CF: Fator de colonização fímbrial de ETEC
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
- CNF: Fator necrosante citotóxico
- DTA: Doenças transmitidas por alimentos
- EAE: Gene de ligação e desaparecimento (*Attaching and Effacing*)
- EAF: Plasmídeo de aderência de EPEC
- EaggEC: *Escherichia coli* enteroagregativa
- EAST: Toxina termoestável de EAEC
- EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasora
- EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EMB: Agar Eosina Azul de Metileno
- EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica
- ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica
- EspA, EspB e EspD: Proteínas secretadas por *E. coli*
- HC: Colite hemorrágica
- HUS: Síndrome urêmica hemolítica
- ISO: International Standard Organization
- LA: Adesão localizada
- LEE: local de destruição do enterócito (*Locus of Enterocyte Effacement*)
- LifA/Efa: Fator para aderência
- LT: Termolábeis
- MDD: Método de Difusão em Disco
- NMP: Número Mais Provável

O: Antígeno somático

OMP: Proteína de membrana externa (“Out Membrane Protein”)

PCR: Reação de polimerase em cadeia (“Polimerase Chain Reaction”)

PET: Enterotoxina plasmidial

PIC: Proteína envolvida na colonização por EAEC

RIPs: Ribossomos inativadores (“Ribosome-Inactivating Proteins”)

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SIM: Agar Sulfide-Indol- Motilidade

ST: Termoestáveis

STEC: *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina

Stx: Shiga toxina

TC: Toxina colérica

TibA: Gene codificador de toxinas e adesão nas ETEC

Tir: Gene receptor para a intimina (“Translocated Intimin Receptor”)

TSA: Agar Triptona de Soja

TTP: Púrpura trombótica trombocitopênica

UPEC: *Escherichia coli* uropatogênica

VT: Verotoxina

VTEC: *Escherichia coli* Verocitotoxigênica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Geral	23
2.2 Específicos	23
3 REFERENCIAL TEÓRICO	24
3.1 Plantas medicinais	24
3.2 Óleos essenciais	26
3.3 Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> Linnaeus - Carolus Linnaeus, 1756)	32
3.4 Gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe, 1807)	37
3.5 <i>Escherichia coli</i>	40
3.5.1 <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC)	45
3.5.2 <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC)	49
3.5.3 <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	51
3.5.4 <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	53
3.5.5 <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC/ EA _g EC)	57
3.5.6 <i>Escherichia coli</i> de Aderência Difusa (DAEC)	59
3.6 Hortaliças	64
4 MATERIAL E MÉTODOS	71
4.1 Coleta das amostras	71
4.2 Isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i>	71
4.3 Testes sorológicos	73
4.4 Extração e análise dos óleos essenciais	74
4.4.1 Amostra vegetal	74
4.4.2 Extração dos óleos essenciais do manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> Linn.) e do gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	74
4.4.3 Análise Cromatográfica (CG/EM)	76
4.4.5 Caracterização físico-química dos óleos essenciais	77

4.4.5.1 Determinação da densidade relativa $^{20}d_{20}$	77
4.4.5.2 Determinação do índice de refração $^{20}n_d$	78
4.4.5.3 Determinação da solubilidade do óleo essencial em álcool 90%	78
4.4.5.4 Cor.....	78
4.4.5.5 Aparência	79
4.5 Antibiograma	79
4.6 Análise estatística	80
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1 Isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i> H₂S positiva isoladas das amostras de alface e do agrião	81
5.2 Frequência e percentual de isolamento de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas isoladas de alfaces e agriões cultivados pelos sistemas orgânico e hidropônico.....	83
5.3 Características físico-químicas e rendimentos dos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre	90
5.4 Composição química dos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)	92
5.5 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre frente a sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas isoladas de alfaces e agrião cultivados pelos sistemas orgânico e hidropônico.....	111
6 CONCLUSÕES	124
7 REFERÊNCIAS.....	126
APÊNDICES.....	162

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o hábito alimentar da população tem mudado consideravelmente. Cada vez mais as pessoas estão conscientes da relação entre dieta equilibrada e prevenção de doenças (MAISTRO, 2001; RIBEIRO et al., 2005). O aumento no consumo de hortaliças *in natura* caracteriza esta mudança, pois estes alimentos fornecem muitos benefícios ao organismo como, por exemplo, o desenvolvimento e regulação orgânica do corpo (NASCIMENTO et al., 2005).

A alface (*Lactuca sativa*) e o agrião (*Nasturtium officinale* R. Br.) estão entre as hortaliças folhosas mais comercializadas e consumidas no Brasil (FERNANDES et al., 2002), as quais, em decorrência da utilização de água de irrigação contaminada por esgotos domésticos, processamento e manipulação inadequada e o uso de adubos orgânicos (estercos) têm sido associadas à transmissão de doenças em função da sua contaminação por bactérias patogênicas tais como: *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Listeria* sp., além de protozoários, helmintos e o vírus da hepatite A (BERBARI; PASCHOALINO, SILVEIRA, 2001; LAGAGGIO, FLORES, SEGABINAZI, 2002). Doenças como diarreia, são facilmente adquiridas pelo consumo de hortaliças (SORIANO et al., 2000; PACHECO et al., 2002).

Entre as espécies de bactérias de origem fecal contaminantes de hortaliças, a *Escherichia coli*, constitui-se em uma das mais importantes em virtude de determinadas linhagens produzirem toxinas que podem exercer um papel relevante na patogenia das doenças, tais como: a hemolisinas, enterotoxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST); verotoxina (VT) ou Shiga toxina (Stx) e o fator necrosante citotóxico (CNF) (GYLES, 1992; BRITO, TAGLIARI, PIFFER, 2001).

As *E. coli* diarreiogênicas estão frequentemente envolvidas em surtos de toxinfecções alimentares, os quais estão associados ao consumo de diversos alimentos tais como: carnes, produtos lácteos, vegetais, suco de maçã não pasteurizado e água. A importância desta espécie está no seu aspecto clínico e epidemiológico que advém da sua resistência a antibióticos convencionais, com complicações, particularmente para crianças e idosos (BUCHANAN, DOYLE, 1997).

A resistência de microrganismos patogênicos para humanos e animais a diferentes antimicrobianos constitui um dos principais problemas enfrentados pelos Órgãos de Saúde Pública em todo o mundo, e em função disto, a busca por novas

substâncias com propriedades antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo as plantas medicinais tem se intensificado, sendo amplamente utilizadas pelas populações de países em desenvolvimento como uma terapia alternativa para a cura de diversas doenças (BAQUERO, BLÁZQUEZ, 1997; SHALE, STIRK, VAN STADEN, 1999).

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) está entre as principais espécies de plantas medicinais amplamente utilizadas na medicina popular, sendo empregado tanto na culinária quanto no combate a diversas enfermidades por possuir ação cicatrizante, antiinflamatória e antimicrobiana. O óleo essencial é extraído do rizoma, o qual tem sido comprovado como agente antibacteriano e antipirético (AFZAL et al., 2001; MARTINS et al., 2001). O gengibre é indicado no tratamento de dores de cabeça, distúrbios gastrintestinais, náuseas, resfriados, osteoartrite e algumas infecções virais como a hepatite C, além de apresentar efeitos anticancerígenos (GRÉGIO et al., 2006).

O manjeriço (*Ocimum basilicum* Linnaeus) é outra planta amplamente utilizada pela população em função de suas propriedades terapêuticas, sendo usado no tratamento de doenças infecciosas do trato respiratório, diarreias, otalmite, dores de cabeça, doenças de pele e pneumonias (ACOSTA et al., 2003), além de propósitos culinários e aromáticos (CARVALHO FILHO et al., 2006). Possui atividade antibacteriana frente a bactérias mesófilas e fungos filamentosos (NAKAMURA et al., 1999).

Não obstante a relevância e atualidade do problema, no Brasil, poucos são os trabalhos que avaliam a contaminação de hortaliças por linhagens de *Escherichia coli* patogênicas e multirresistentes a antimicrobianos convencionais. Desse modo, a pesquisa e descoberta de novos compostos com propriedades antimicrobianas a partir de fontes naturais, como os óleos essenciais é de extrema importância, os quais podem desempenhar um importante papel no combate a microrganismos patogênicos e multirresistentes, tais como a *Escherichia coli* e outros agentes infecciosos contaminantes em hortaliças.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjericão (*Ocimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças.

2.2 Específicos

- Determinar a presença de *Escherichia coli* nas hortaliças (alface e agrião) por meio de pré-enriquecimento e plaqueamento em Agar seletivo;
- Identificar a *Escherichia coli* utilizando os métodos de identificação bioquímica convencionais, sistema API-20E (bioMérieux) e sorológicos;
- Extrair o óleo essencial das folhas do manjericão e do rizoma do gengibre para posterior cálculo de rendimento;
- Determinar as características físico-químicas dos óleos essenciais em relação às análises de densidade, solubilidade em etanol a 90%, índice de refração, cor e aparência;
- Quantificar os principais componentes dos óleos essenciais, usando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM);
- Avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjericão e do gengibre frente as linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças utilizando-se o Método de Difusão em Discos (MDD).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas medicinais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são definidas como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, compostos que podem ser utilizados com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. A utilização das plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, se constitui em uma das mais antigas formas de prática medicinal da Humanidade. No início da década de 1990, a OMS divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR, PINTO, MACIEL, 2005).

As plantas são uma importante fonte de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Simões et al., (2007) relataram que pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidades em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. Também, apesar do aumento das pesquisas nessa área, os dados disponíveis demonstram que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal.

Dessa forma, Soares (2005) diz que o interesse no potencial das plantas medicinais é fruto do incentivo dado pela OMS, que após 1978, reconheceu a importância das plantas medicinais na cura de doenças, recomendando a divulgação, em nível mundial, dos conhecimentos necessários para o uso dessas plantas. De acordo com Nascimento (2004), estima-se que 80% da população mundial ainda utilizem direta ou indiretamente as plantas para o tratamento de doenças.

Holetz et al., (2002) informam que as plantas são usadas na forma de extratos crus, infusões ou emplastros para o tratamento de infecções comuns, sem qualquer evidência científica de sua eficácia. Contudo, Essawi e Srour (2000)

comentaram que em vários países as plantas medicinais são empregadas como agentes antibacterianos, antifúngicos e antivirais.

Algumas espécies vegetais sintetizam substâncias de defesa quando são “agredidas” por bactérias, fungos, parasitas, vírus ou outros agentes. Estes compostos são produtos do seu metabolismo secundário, tendo composição química muito variada. Dentre os compostos com ação antimicrobiana estão: terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e saponinas), compostos fenólicos (fenóis simples, taninos, dibenzofuranos e flavonóides), compostos nitrogenados (alcaloides, polipeptídeos cíclicos, glicosídeos), cumarina e cânfora (SIMÕES et al., 2007; RESCHKE, MARQUES, MAYWORM, 2007)

Segundo Nascimento (2004), a descoberta de novos compostos antimicrobianos tem despertado interesse da comunidade científica devido a um aumento na taxa de infecções causadas por microrganismos resistentes a diversos antibióticos. Nesse contexto, Salvat et al., (2001) relata que muitas pesquisas com substâncias biologicamente ativas, isoladas de plantas, têm sido fontes de agentes terapêuticos.

Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta Amazônica e a mata atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas. Além disso, muitas plantas exóticas foram introduzidas no Brasil desde a colonização e incorporadas na medicina popular (ALVES et al., 2000).

No Brasil, as investigações sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana aumentaram significativamente nos últimos anos. Entretanto, apesar da rica biodiversidade, somente estão disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas. O baixo número de registros pode ser consequência da disseminação restrita dos resultados de pesquisa, além disso, a maioria das pesquisas são testes isolados com uma ou poucas espécies, geralmente baseados em informações etnofarmacológicas, diferentemente de pesquisas que abrangem a flora de uma região definida, onde várias famílias botânicas são pesquisadas (SARTORATTO et al., 2004).

Uma vez que as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que programas de

triagem possam descobrir compostos que possam ser utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos. Entretanto, as investigações científicas visando determinar o potencial terapêutico das plantas são limitadas, existindo a falta de recursos e de pesquisas científicas experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número dessas plantas. Nessas pesquisas, o que se espera é que os compostos atinjam nas células alvos diferentes daqueles utilizados pelos antibióticos conhecidos e que sejam ativos contra patógenos resistentes (AHMAD, BEG, 2001).

As substâncias ativas presentes nas plantas medicinais são consequência do metabolismo secundário. Dentre essas substâncias estão: os óleos essenciais, resinas, alcalóides, flavonóides, taninos, terpenos, fenilpropanóides, dentre outros (CASTRO et al., 2001).

3.2.Óleos essenciais

Os óleos voláteis ou essenciais são definidos pela International Standard Organization - ISO (Organização Internacional de Padrões) como sendo os produtos obtidos de partes de plantas extraídos por destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES et al., 2007).

De acordo com Bruneton (2001) os óleos essenciais podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Essas denominações são atribuídas em função de algumas das características físico-químicas dos óleos voláteis, tais como a de serem líquidos e de aparência oleosa à temperatura ambiente (advindo, daí, a designação de óleo), a sua volatilidade, o que os diferencia dos óleos fixos, aroma agradável e intenso (denominação de essências), solubilidade em solventes orgânicos apolares, como o éter, recebendo por isso a denominação de óleos etéreos ou em latim, *aetheroleum*. Em água, os óleos essenciais apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são chamadas de hidrolatos.

Segundo Bakkali et al. (2008), os gêneros capazes de elaborar os constituintes que compõem os óleos essenciais estão divididos em várias famílias, tais como: *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Cupressaceae*, *Zingiberaceae*, *Poaceae*, *Myristicaceae*, *Piperaceae*, dentre outras. Geralmente, a síntese e o acúmulo dos óleos essenciais estão associados à presença de estruturas histológicas especializadas, localizadas sobre ou nas proximidades da superfície da planta, tais como em pêlos glandulares (*Lamiaceae*), células parenquimáticas diferenciadas (*Laureaceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*), canais oleíferos (*Apiaceae* e *Asteraceae*) ou glândulas secretoras (*Myrtaceae*). Os óleos essenciais podem armazenar-se em todos os órgãos vegetais, tais como: nas flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes (vetiver), rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva doce) ou sementes (noz-moscada) (SIMÕES et al., 2007).

Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar segundo a localização. Por exemplo, o óleo das cascas da canela é rico em aldeído cinâmico, enquanto que os das folhas e das raízes desse mesmo vegetal são ricos em eugenol e cânfora, respectivamente. Outro fato importante é que, os óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores bem definidos. É válido ressaltar também que, a composição química de um óleo essencial, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo (BURT, 2004).

Dentre as características físicas apresentadas pelos óleos essenciais está a coloração, os quais são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados quando recentemente extraídos. São poucos os óleos que apresentam coloração, como o óleo essencial de camomila, de coloração azulada, pelo seu alto teor em azulenos, o sabor geralmente acre (ácido) e picante, a densidade em geral é inferior a da água (os óleos essenciais de canela e cravo constituem exceções), índice de refração elevado e a maioria desviam a luz polarizada (opticamente ativos), propriedades utilizadas na identificação e controle da qualidade. Os óleos essenciais não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais, são

lipossolúveis e solúveis nos solventes orgânicos habituais (BRUNETON, 2001; SIMÕES et al., 2007).

Por estarem presentes em diversas partes das plantas, os óleos essenciais possuem uma gama variável de constituintes formados por centenas de substâncias químicas - como alcoóis, aldeídos, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos - havendo sempre a prevalência de uma, duas ou três delas, que irão caracterizar as fragrâncias (OKPEKON et al., 2004; FERREIRA et al., 2006). No entanto de maneira quase exclusiva, são constituídos por terpenóides e compostos aromáticos derivados do fenilpropano (BAKKALI et al., 2008). Os monoterpenos e os sesquiterpenos são os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais (MARRIOTT, SHELLIE, CORNWELL, 2001).

Os monoterpenos encontrados nos óleos essenciais podem ser divididos em três subgrupos: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos (α -terpineol e terpinoleno) e bicíclicos (α -pineno, tujona, cânfora, fenchona). Em cada um desses subgrupos, há ainda outras classificações: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (mentol), aldeídos ou cetonas (mentona, carvona), lactonas e as tropolonas (γ -tujaplicina). As variações estruturais dos sesquiterpenos são da mesma natureza que as precedentes, podendo ser acíclicos (farnesol, nerolidol), monocíclicos (ácido abscísico), bicíclicos (γ -bisaboleno, β -selineno, cariofileno) ou lactonas sesquiterpênicas. O número de compostos terpênicos conhecidos ultrapassa a 8.000; como componentes descritos em óleos essenciais, é estimado um número superior a 150 monoterpenos e 1.000 sesquiterpenos (SIMÕES et al., 2007).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influi sobre a composição química dos óleos essenciais. A temperatura, a umidade relativa, duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influencia direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície. Nos vegetais em que a localização de tais estruturas é mais profunda, a qualidade dos óleos essenciais é mais constante (TEUSCHER, 1990).

Para a extração dos óleos essenciais são utilizados vários métodos, os quais variam conforme a localização do óleo na planta e com a proposta de

utilização. Os mais comuns são: enfloração (*Enfleurage*), hidrodestilação, arraste por vapor d'água, extração por solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico (MAUL, WASICKY, BACCHI, 1998; SIMÕES et al., 2007).

A conservação dos óleos essenciais, em função da relativa instabilidade das moléculas que os constituem, torna-se difícil, uma vez que podem sofrer diferentes tipos de degradação: fotoisomerização, fotociclização (citrais), ruptura oxidativa de propenilfenóis, peroxidação de hidrocarbonetos e decomposição de cetonas e álcoois (limoneno), termoisomerização (citrais), dentre outras. Estas degradações podem modificar as propriedades e/ou pôr em dúvida a inocuidade do produto (COSTA, 1994).

Os procedimentos para realização do controle de qualidade de matérias primas vegetais ricas em óleos voláteis são descritos em farmacopéias. Diferentes ensaios podem ser utilizados para a identificação dessas alterações, tais como: avaliação da miscibilidade em etanol, medidas físicas (índice de refração $[\eta]_D^{20}$, rotação óptica $[\alpha]_D^{20}$, densidade relativa $[d]^{20}$, viscosidade e às vezes ponto de solidificação), determinação de índices de acidez, ésteres do ácido ftálico, em algumas ocasiões, busca de óleos graxos e óleos essenciais resinificados, determinação do resíduo de evaporação, dentre outros. A deterioração dos óleos essenciais reduz seu valor comercial, além de constituir um fator de risco quando eles são destinados ao uso externo, já que podem provocar alergias (BRUNETON, 2001).

As análises de misturas complexas de multicomponentes como os óleos essenciais requerem a aplicação de métodos analíticos modernos e instrumentação adequada. As técnicas analíticas permitem a avaliação da qualidade do óleo essencial, garantindo, assim, à constância de seus constituintes químicos e a segurança de sua utilização. A avaliação quantitativa e qualitativa envolve a utilização de diversas técnicas básicas, que passaram por algumas alterações nos últimos anos, devido essencialmente à revolução da informática e da sofisticação dos experimentos que podem ser realizados resultando na dedução de uma estrutura coerente (JENNINGS, MITTLEFEHLDT, STREMPLE, 1997).

Dentre as técnicas utilizadas para separar e quantificar substâncias componentes dos óleos essenciais, a Cromatografia Gasosa (CG) é geralmente a mais utilizada em função do seu alto poder de diferenciação e por ser um método

simples usado para separação e quantificação dos componentes de óleos essenciais. No entanto, outros métodos como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectroscopia de Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV) e a Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13 (RMN ^{13}C) também são utilizadas para a análise de óleos essenciais (SIMÕES et al., 2007).

Para ter maior segurança na identificação dos picos e controlar a pureza de um pico cromatográfico, é recomendável analisar um óleo essencial também por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM). Esse método permite como, a CG, a separação dos componentes e fornece, ainda, um espectro de massas para cada pico. O espectro de massa geralmente indica a massa molecular e o padrão de fragmentação. O padrão de fragmentação pode ser comparado com outros constantes da biblioteca de espectros de massas, onde propostas de probabilidade quanto à identidade das substâncias são analisadas (JENNINGS, MITTLEFEHLDT, STREMPLE, 1997).

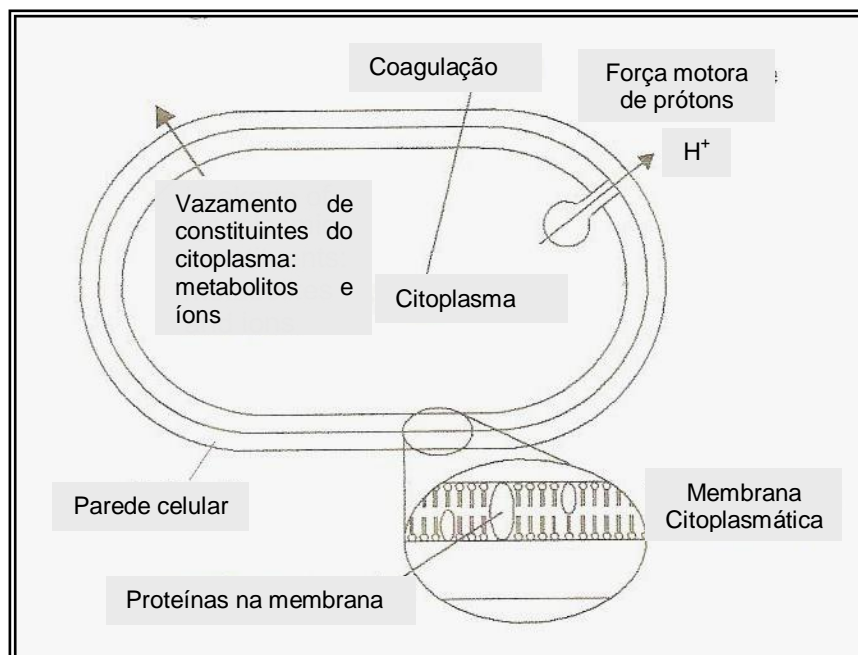
As substâncias odoríferas em plantas foram por muito tempo consideradas como “desperdício fisiológico” ou mesmo produtos de desintoxicação, como eram vistos os produtos do metabolismo secundário. Atualmente, considera-se a existência de funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura, entre outras (HARBORNE, 1993).

As propriedades farmacológicas dos óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas e medicinais, embora sejam conhecidas desde a Antigüidade, apenas nas últimas décadas o uso destes compostos como antimicrobianos naturais se intensificou devido a sua aplicação na conservação de alimentos e no controle de enfermidades de origem microbiana (SMITH-PALMER, STEWART, FYFE, 1998; BARATTA et al., 1998).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está associada à presença de vários componentes, como timol, carvacrol, eugenol, cineol, linalol, terpineol, pipeno, cariofileno e citral, dentre outros (LEMOS et al., 1990; MAHMOUND, 1994; ANSARI, ALI, SIDDIQUI, 1996). Por outro lado, carvacrol, citronelol, eugenol, geraniol e limoneno foram testados como conservantes de alimentos com muita eficácia, sem qualquer demonstração mutagênica celular (SVOBODA, HAMPSON, 1999).

Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, o mais provável é que sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um único mecanismo, mas que existam vários alvos na célula (CARSON, MEE, RILEY, 2002; SKANDAMIS, NYCHAS, 2002).

De acordo com Burt (2004), dentre os modos de ação dos óleos essenciais estão: (1) interferência com a bi-camada fosfolipídica da membrana celular, característica que permitiria a partição destes compostos nos lipídeos da membrana celular e da mitocôndria, levando a mudanças no potencial da membrana citoplasmática aumentando sua permeabilidade para prótons e íons de potássio, levando a perda do conteúdo celular (lise); (2) prejudicar uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia e síntese de componentes estruturais e (3) destruição ou inativação de material genético (KIM, MARSHALL, WEI, 1995; COWAN, 1999; FRIEDMAN, 2006). Os prováveis locais ou mecanismos de ação dos óleos essenciais nas células bacterianas estão indicados na Figura 1.



Fonte: Burt, (2004).

Figura 1. Localização e mecanismo de ação dos componentes dos óleos essenciais sobre alvos na célula bacteriana.

Uma importante característica dos óleos essenciais e seus componentes é sua hidrofobicidade, a qual os capacita a interagir na camada lipídica da

membrana celular bacteriana e mitocôndrias, perturbando a estrutura deixando-a mais permeável (SIKKEMA, DE BONT, POOLMAN, 1994). O vazamento de íons e outros componentes celulares pode ocorrer, sendo que, a perda de conteúdo celular ou a saída de moléculas e íons críticos provocará a morte celular (COX et al., 2000; ULTEE, BENNINK, MOEZELAAR, 2002).

Juven et al., (1994) e Sikkema, De Bont, Poolman (1995) comentaram que os componentes dos óleos essenciais também podem agir sobre proteínas celulares localizadas nas membranas citoplasmáticas, entre elas as ATPases, em função do acúmulo de hidrocarbonos cíclicos na camada lipídica e conseqüente destruição da interação lipídeo-proteína. Alternativamente, é possível uma interação direta de compostos lipofílicos com porções hidrofóbicas das proteínas.

Pela sua crescente utilização nas indústrias de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas), cosméticos (perfumes e produtos de higiene) e farmacêutica, o cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos voláteis constituem importante atividade econômica (SIMÕES et al., 2007). No entanto, é importante assinalar que, atualmente apesar dos óleos essenciais serem amplamente utilizados nas indústrias de alimentos e perfumaria, o seu uso como fármaco requer cuidados especiais. A maioria dos constituintes dos óleos essenciais é lipofílica e por isso são rapidamente absorvidos tanto por via pulmonar como por via cutânea ou digestiva (BRUNETON, 2001).

3.3. Manjeriço (*Ocimum basilicum* Linnaeus - Carolus Linnaeus, 1756)

A família *Lamiaceae* é composta aproximadamente de 220 gêneros e 3.500 a 4.000 espécies (ALMEIDA, ALBUQUERQUE, 2002). Dentre as espécies dessa família, destacam-se várias espécies usadas como condimentos, tais como: *Salvia officinalis* (sálvia), *Origanum vulgare* L. (orégano), *Origanum majorana* L. (manjerona), *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca) dentre outras (PORTE, GODOY, 2001).

O gênero *Ocimum* é constituído por mais de 150 espécies originárias de regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América Central e do Sul, sendo considerado um dos maiores gêneros da família *Lamiaceae* (LABRA et al., 2004).

Dentre as espécies pertencentes a essa família se encontram no Brasil, como naturalizadas ou cultivadas, o *Ocimum basilicum* L., *O. americanum* L., *O. gratissimum* L., *O. minimum* L., e o *O. tenuiflorum* L. A África é, provavelmente, o centro da diversificação e da origem das espécies sudamericanas de *Ocimum* (ALBUQUERQUE, ANDRADE, 1998). Além das espécies citadas anteriormente, outras têm se destacado em função da produção de óleos essenciais e de sua utilização na medicina popular, na culinária ou como repelentes de insetos, dentre estas estão: *O. trichodon*, *O. urticifolium*, *O. viride* Linn, *O. suave* Linn, e *O. canum* (PEREIRA, MAIA, 2007).

Várias características no que refere ao crescimento, tamanho, morfologia e cores das folhas, cor das flores e aroma são observadas na grande diversidade de espécies que compõem o gênero *Ocimum* (MIELE et al., 2001). Dentre essas, está o manjericão doce (sweet basil), um subarbusto aromático, anual ou perene (dependendo do local onde é cultivado), ereto e muito ramificado, de 30-50cm de altura. As espécies de manjericão foram introduzidas no Brasil na época de seu descobrimento por duas rotas. A primeira, por colonizadores portugueses e por imigrantes Europeus (italianos, alemães e poloneses). A segunda rota por escravos trazidos da África (ALBUQUERQUE 1996; LORENZI, MATOS, 2002).

A nomenclatura correta para as espécies e variedades do gênero *Ocimum* da família *Lamiaceae*, na qual o manjericão está incluído, é de grande interesse, uma vez que mais de 60 espécies e formas têm sido relatadas, sendo questionável a verdadeira identidade botânica do manjericão citado em algumas literaturas. A dificuldade na classificação das diferentes variedades de manjericão provavelmente ocorra em virtude da planta sofrer polinização cruzada resultando em um grande número de subespécies e variedades, as quais diferem na composição do óleo essencial e características morfológicas (VINÃ, MURILLO, 2003; BLANK et al., 2004).

As diferenças apresentadas pelos vários cultivares de manjericão estão na morfologia das folhas, podendo apresentar folhas pequenas ou grandes, linheformes ou circulares, ondulares ou crespas; na cor que pode variar do verde ao roxo escuro, na cor das flores que podem variar de brancas, púrpuras ou roxas (Figura 2), nas características de crescimento (forma, altura e época da florada), e no aroma, característica de maior interesse econômico (LABRA et al., 2004; SAJJADI, 2006).



Fonte: Coelho, (2009).

Figura 2. Alguns exemplos das características morfológicas de diferentes variedades de manjericão: (A) manjericão de folhas verdes, grandes e linheformes com flores brancas (*Ocimum basilicum* L. - utilizado na pesquisa); (B) folhas e caule roxos (*Ocimum basilicum* var. *purpurascens*) (C) folhas verdes, grandes e circulares (*Ocimum basilicum* Genovence, tipo folha de alface); (D) flores roxas.

O aroma do manjericão é determinado em função da presença de componentes voláteis, essencialmente fenilpropanóides, monoterpênicos e derivados, produzidos em estruturas altamente especializadas, conhecidas como tricomas glandulares, localizadas em ambos os lados das folhas, sendo que o óleo essencial é estocado no envoltório da glândula (DE MASI et al., 2006). Segundo Blank et al., (2004) de acordo com o aroma, os manjericões podem ser classificados em doce, limão, cinamato ou canela, cânfora, anis e cravo. Porém, para as características morfológicas da planta, o manjericão pode receber uma nomenclatura dependendo do porte, formato da copa, tamanho e coloração da folhagem.

No Brasil, o manjeriço é cultivado por pequenos agricultores (hortas domésticas) para uso medicinal e culinário, sendo comercializado na forma fresca ou seca em feiras e supermercados, sendo comumente conhecida como alfavaca, manjeriço ou basilicão, porém alfavaca cheirosa, basílico grande, erva real, manjeriço de molho são outras denominações populares da espécie. Esta planta é amplamente utilizada em função de suas propriedades terapêuticas, tais como no alívio de espasmos, antitérmico, auxilia também na digestão e no combate de infecções bacterianas e parasitas intestinais (CARVALHO FILHO et al., 2006).

Os óleos essenciais extraídos das folhas e ápices com inflorescência de diferentes cultivares de manjeriço geralmente por hidrodestilação, têm sido tradicionalmente classificados dentro de quatro distintos quimiotipos com vários subtipos de acordo com os componentes majoritários do óleo e a região geográfica de origem: quimiotipo europeu, originário da Itália, França, Bulgária, Egito e sul da África, Reunião, que tem sua origem na Tailândia, Madagascar e Vietnam, o quimiotipo Tropical, da Índia, Paquistão e Guatemala, e o Java, originário do Norte da África e Rússia (SUPPAKUL et al., 2003; TELCI et al., 2006). O Quadro 1 demonstra a classificação quimiotaxonômica do óleo essencial do manjeriço de acordo com a região de origem.

Quadro 1. Classificação quimiotaxonômica do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) baseado na origem geográfica

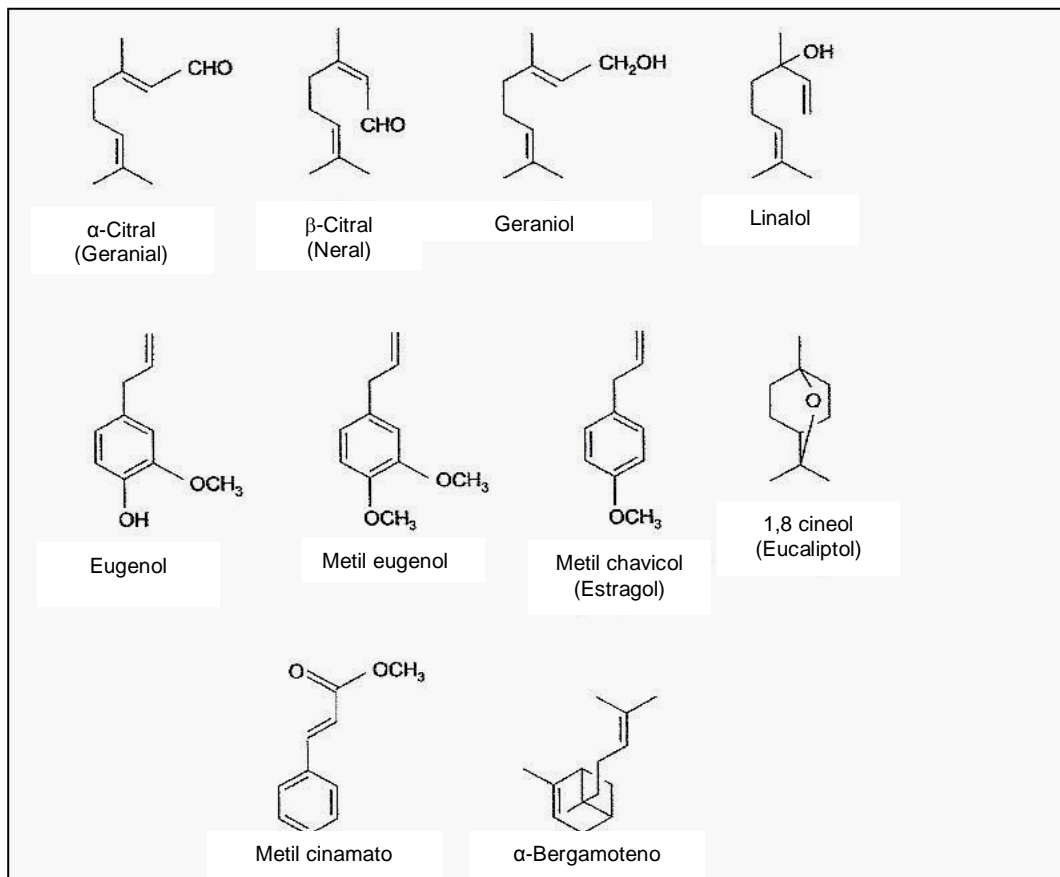
Quimiotipo	Constituinte majoritário	Pais de origem
Europeu	Linalol, metil chavicol	França, Itália, Egito, Sul da África, Estados Unidos e Hungria
Reunião	Metil chavicol	Ilhas Comoro, Tailândia e Vietinã
Tropical	Metil cinamato	Bulgária, Índia, Guatemala, Paquistão
Java	Eugenol	Indonésia, Norte da África e Rússia

Fonte: Suppakul et al., (2003).

O óleo do manjeriço tipo europeu é o óleo mais valorizado no mercado, contendo como principais constituintes o linalol (40,5 - 48,2%) e o metil chavicol (estragol) (28,9 - 31,6%) (CHARLES, SIMON, 1990). O preço do óleo essencial de manjeriço doce no mercado internacional atinge valor próximo a US\$ 110,00/L.

Este valor sugere que o cultivo do manjeriçãõ doce para a obtençãõ de óleo essencial pode ser promissora, sendo uma atividade alternativa para pequenos produtores rurais (BLANK et al., 2004).

Em função dos diferentes quimiotipos a composiçãõ química e o teor do óleo essencial de manjeriçãõ podem ser bastante variáveis, conforme a variedade genética, o solo, regiãõ geográfica e a espécie. O teor do óleo pode se encontrar na faixa entre 1,5 e 3% (p/p) (MARTINS, 2000). As estruturas químicas dos principais constituintes do óleo essencial de manjeriçãõ estãõ apresentadas na Figura 3.



Fonte: Suppakul et al., (2003).

Figura 3. Estruturas dos principais componentes encontrados no óleo essencial do manjeriçãõ.

A atividade antimicrobiana de diferentes espécies do gênero *Ocimum* tem formado a base de muitas aplicações, incluindo o seu uso *in natura* e processadas na conservaçãõ de alimentos, na medicina alternativa e terapias naturais (BOZIN et al., 2006). O óleo essencial do manjeriçãõ tem sido amplamente utilizado em alimentos como flavorizante para produtos de confeitaria, condimentos (catchups,

pastas de tomate, pickles e vinagres), em lingüiças e carnes, bebidas não alcoólicas, sorvetes, dentre outros, tendo também ampla utilização na indústria de cosméticos na produção de xampus, produtos dentais, orais e perfumes (KATARZYNA et al., 1996). O manjeriço é utilizado na medicina popular para aliviar problemas respiratórios, como anti-séptico, digestivo e contra parasitas intestinais (antiespasmódico) (LORENZI, MATOS, 2002). A atividade antiviral e antimicrobiana dessa planta também foram relatadas por Baratta et al., (1998), Fernandes et al., (2004) e Chiang et al., (2005).

As propriedades antimicrobianas e antifúngicas do óleo essencial de diferentes espécies de *Ocimum* têm sido predominantemente associadas com os constituintes majoritários, linalol e metil chavicol (LACHOWICZ et al., 1998). Vários pesquisadores têm relatado sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído do manjeriço contra microrganismos patogênicos. Meena e Sethi (1994) descreveram o óleo essencial de manjeriço como sendo eficiente no combate a bactérias Gram positivas e Gram negativas, leveduras e mofos. Acosta et al., (2003) ao avaliarem a composição química e a atividade antimicrobiana de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Ocimum* frente ao *Staphylococcus aureus* e a *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes de origem nosocomial constataram uma ação inibitória efetiva por parte do óleo essencial de manjeriço.

3.4. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe, 1807)

O gengibre, cientificamente conhecido como *Zingiber officinale* Roscoe, foi primeiramente descrito em 1807 pelo botânico inglês William Roscoe. Pertencente à família *Zingiberaceae*, a qual engloba mais de 1.200 espécies de plantas incluídas em 53 gêneros, o gênero *Zingiber*, inclui aproximadamente 85 espécies. Botanicamente, o gengibre está assim categorizado:

- Reino: *Pantae*;
- Filo: *Magnoliophyta*;
- Classe: *Liliopsida*;
- Ordem: *Zingiberales*;
- Família: *Zingiberaceae* Lindl.;

- Gênero: *Zingiber*;
- Espécie: *Zingiber officinale* Roscoe (ELPO, 2004)

A planta do gengibre é herbácea, perene e produz um rizoma articulado, carnoso, revestido de epiderme rugosa e de cor pardacenta (Figura 4). O rizoma do gengibre apresenta corpo alongado, um pouco achatado, com uma coloração que vai do amarelo couro à marrom brilhante, é estriado na longitudinal, algumas vezes fibroso, com terminações conhecidas como “dedos” que surgem obliquamente dos rizomas. Internamente, de cor marrom-amarelada, apresenta uma endoderme amarela, com numerosos feixes fibrovasculares e abundantes células oleaginosas contendo oleoresina e 0,5% a 1,5% de óleo essencial. Apresenta odor agradável e aromático e sabor fortemente pungente (MAGALHÃES et al., 1997; ZANCAN et al., 2002).



Fonte: Elpo, (2004).

Figura 4. *Zingiber officinale* Roscoe: vista geral da planta e do rizoma

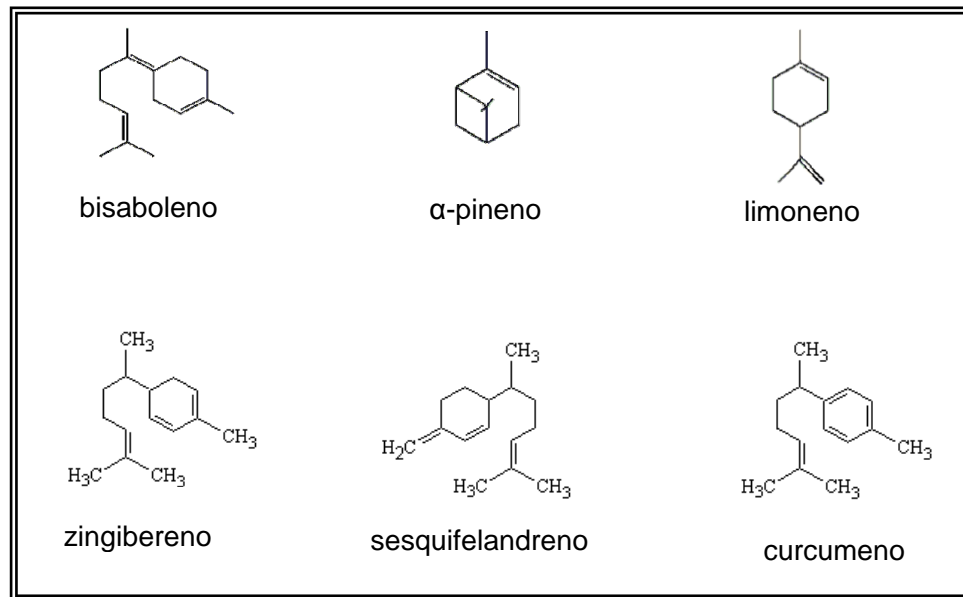
Conhecido e utilizado praticamente em todo o mundo e em todas as medicinas, o gengibre, é cultivado há milhares de anos na China e Índia, chegando

ao Ocidente há pelo menos dois mil anos. O nome deste gênero, *Zingiber*, deriva de uma palavra em sânscrito que significa em “forma de chifre” em referência às protuberâncias na superfície do rizoma. O gengibre recebe diversas denominações, dentre as quais: gengibre, ajengibre, jengibre dulce (Brasil, Argentina e Espanha), ginger (Estados Unidos e Inglaterra), gengembre (França) (CORRÊA JUNIOR, MING, SCHEFFER, 1994; MORGAN, 1994).

O cultivo do gengibre foi introduzido no Brasil logo após o início da colonização européia. No entanto, somente nas últimas décadas, após a introdução de variedades de rizomas gigantes por agricultores japoneses, a cultura do gengibre tornou-se efetivamente comercial no Brasil, especialmente nos litorais de Santa Catarina, São Paulo e do Paraná. A Índia, China e Nigéria estão entre os principais produtores mundiais de gengibre (ELPO, 2004).

A composição do óleo essencial do gengibre pode variar conforme a origem geográfica, secagem, época de colheita e tipo de adubação. Dentre os principais constituintes do óleo essencial do gengibre estão: monoterpenos: (α), (β)-pineno, canfeno, mirceno, limoneno, β -felandreno; sesquiterpenos: zingibereno, curcumeno, β -farneseno, β -cariofileno, bisaboleno, sesquifelandreno; alcoóis: 2-butanol, 2-metil-but-3-en-2-ol, citronelol, zingerenol, β -eudesmol; aldeídos: butanal, 2-metil-butanal, pentanal, citronelal, neral, geranial; cetonas: zingerona, criptona, carvotanacetona e óxidos como o 1,8-cineol (Figura 5) (ZARATE, SUKRASNO, YEOMAN, 1992).

Como planta medicinal, o gengibre é uma das mais antigas e populares do mundo. Suas propriedades terapêuticas são resultado da ação de várias substâncias, especialmente do óleo essencial que contém canfeno, felandreno, zingibereno e zingerona (ZARATE, SUKRASNO, YEOMAN, 1992). Várias propriedades do gengibre foram comprovadas em experimentos científicos, destacando-se as atividades anti-inflamatória, antiemética e antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica, antibacteriana, entre outras. Além das propriedades terapêuticas, o gengibre é usado também na culinária como condimento ou no preparo de bebidas tais como a ginger beer e, principalmente na forma de chás (HABSAH et al., 2000; DEDOV et al., 2002).



Fonte: Afzal et al., (2001).

Figura 5. Algumas estruturas de componentes encontrados no óleo essencial do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)

As plantas da família *Zingiberaceae*, em geral, apresentam ingredientes pungentes, os quais provocam a sensação de ardência, tais como o 6-gingerol e 6-paradol, os quais possuem efeito antitumoral, analgésico, antipirético, atividade anti-hepatotóxica e antinauseante (GRÉGIO et al., 2006). Cai et al., (2004) citaram o efeito antioxidante de 112 ervas chinesas, dentre elas o gengibre, evidenciando a potencial aplicação desta especiaria como fonte de antioxidantes naturais. O óleo essencial de gengibre é fototóxico; portanto, nunca usá-lo antes de se expor o corpo ao sol. Usar com moderação em massagens e banhos aromáticos, evitando alergias em peles sensíveis (TESKE, TRENTINI, 1995).

3.5. *Escherichia coli*

Escherichia coli (Figura 6) pertence à família *Enterobacteriaceae* e é predominante na microbiota do trato intestinal de humanos e de outros animais, e em função disso, é utilizada como indicador de contaminação de origem fecal em água desde 1892 e posteriormente em alimentos (AMÂNCIO, PEREIRA, CARVALHO, 2003). É classificada como bastonete reto, Gram negativo, não

esporogênica, móvel (flagelos peritríquios) ou imóvel e anaeróbia facultativa. Fermenta lactose e outros carboidratos, produzindo ácido pirúvico que é convertido em ácido láctico, acético ou fórmico com produção de CO₂ e H₂. Reduz nitrato a nitrito e é oxidase negativa. Produz usualmente o indol, apresenta reação negativa de Voges-Proskauer e positiva para o vermelho de metila e não utiliza o citrato como única fonte de carbono. É produtora de catalase e lipase, hidrolisa uréia, mas é negativa para a produção de H₂S. Pode ser isolada facilmente de espécimes clínicos em meios de cultura comuns ou seletivos incubados à 37°C sob condições aeróbicas e identificadas por testes bioquímicos (HOLT et al., 1994; TRABULSI, 2008).



Fonte: Food Safety Smart, (2009).

Figura 6. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* foi isolada pela primeira vez por Theodore Escherich (1855), um bacteriologista alemão, o qual descreveu um microrganismo que se encontrava em altas densidades nas fezes humanas que foi por ele nomeado de *Bacterium coli commune*. Somente em 1945, entretanto, essa bactéria foi definitivamente associada à diarreia infantil por Bray (1945), e por ele denominada *Bacterium coli neapolitanum* (BERTÃO, SARIDAKIS, 2007).

No início do século passado (1912), o *Bacterium coli* (*Bacterium* = forma de bastonete, *coli* = colon, o seu habitat natural) já era utilizada como indicador da qualidade sanitária da água. No ano de 1950, em homenagem ao seu “descobridor”, esta bactéria passou a ser denominada *Escherichia coli* pelos microbiologistas e foi escolhida como modelo para estudos de processos biológicos básicos, tais como

vias metabólicas, regulação gênica, transdução de sinais, estrutura de parede celular e conjugação (KUHNERT, BOERLIN, FREY, 2000).

O gênero *Escherichia* é composto por seis espécies: *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* e a *E. albertii*, uma nova espécie que é bioquimicamente similar a *Hafnia alvei*, rara em humanos, no entanto, também causa doenças diarréicas (HUYS et al., 2003). Sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C, mas cresce desde 2,5°C até a 45,5°C. A *E. coli* O157:H7 resiste até a 64,3°C por 9,6 segundos ou a 57,2°C por 270 segundos. Seu pH ótimo está entre 7,2 a 7,5, porém se desenvolvem em meios com pH de 4,0 a 8,5 para a *E. coli* O157:H7 e, 9,0 para as outras. Sua resistência a salinidade segue até 8% de NaCl (BOPP et al., 1999; KUHNERT, BOERLIN, FREY, 2000; GONÇALVES, MARQUES, LUCCA, 2002).

As bactérias do gênero *Escherichia*, segundo Rodríguez-Angeles (2002) colonizam o intestino do homem poucas horas após seu nascimento e são consideradas como componentes da microbiota normal transitória do intestino. A maioria das linhagens de *E. coli* são comensais, tendo como principal função a regularização dos processos intestinais de decomposição e a produção de vitaminas K e B₁₂. As *E. coli* comensais não possuem genes de virulência associados à patogenicidade, porém, as *E. coli* consideradas patogênicas são causadoras de uma variedade de doenças, incluindo diarreia, disenteria, colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica, infecções de bexiga e rim, septicemia, pneumonia e meningite (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 1996; CLARKE, 2001; KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

Embora a *E. coli* seja encontrada no ambiente e ocorra como um comensal no intestino de mamíferos, o evento de transferência horizontal de gene tem permitido a transição de algumas *E. coli* da categoria de comensais para patogênicas, geralmente pela aquisição da ilha de patogenicidade. Esses eventos de transferência ocorrem independentemente de uma ou outra bactéria apresentar diferentes genes de virulência fixos (BAUMLER, TSOLIS, HEFFRON, 1996).

Muitas bactérias entéricas comensais, incluindo a *E. coli*, já possuem alguns dos genes requeridos para a interação com as células do hospedeiro, mas faltam certos genes para fazê-la totalmente patogênica. Sendo assim, se particular agrupamento de genes, tais como os que codificam o fenômeno de ligação e desaparecimento A/E (*Attaching-Effacing*) presentes no grupo das *E. coli* EPEC são

transferidos para *E. coli* comensais, transformando-as em patogênicas (McDANIELS et al., 1995).

O estudo da virulência em *E. coli* tem se concentrado nas doenças do trato urinário e intestinal, uma vez que ela está fortemente associada com a diarreia humana, principalmente a infantil. Conseqüentemente, a *E. coli* tem um importante papel na mortalidade infantil nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (PELCZAR et al., 1996).

O primeiro caso de diarreia associada a uma linhagem de *E. coli* data do ano de 1945. O conhecimento a respeito de como esta bactéria causa diarreias tem aumentado significativamente. Como todos os microrganismos que causam diarreia, a *E. coli* é adquirida pelo consumo de alimentos e águas contaminados com fezes humanas ou de outros animais, no entanto os mecanismos de patogenicidade dessa bactéria são complexos e envolvem um grande número de fatores de virulência, que variam em função de suas diferentes categorias. Muitos destes fatores parecem ter sido adquiridos de outros patógenos entéricos, como *Vibrio cholerae* e *Shigella dysenteriae* (GILLIGAN, 1999). Toxinas e mecanismos de adesão são os fatores de virulência mais comumente encontrados em *E. coli*. Algumas toxinas são intimamente relacionadas com determinados sorotipos desta bactéria (KUHNERT, BOERLIN, FREY, 2000).

A sorotipagem da *Escherichia coli* ocupa um lugar central na história deste patógeno. A distinção sorológica entre as linhagens de *E. coli* enteropatogênicas foi importante nos primeiros estudos, mostrando o predomínio de certos sorotipos nas ocorrências de diarreias infantis. A identificação sorológica é baseada nas diferenças antigênicas encontradas em certas estruturas superficiais das células, particularmente na membrana externa (antígenos O), nos flagelos (antígenos H) e no envelope celular ou cápsula (antígenos K) (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

O antígeno somático (O) tem sua base química na diversidade de polissacarídeos presente na membrana externa da parede celular das bactérias Gram negativas. Os antígenos O são termoestáveis (100°C ou 120°C/2h) e atualmente há mais de 170 grupos sorológicos conhecidos (BURKS, LOGAN, 2001). O antígeno flagelar (H) possui estrutura de natureza protéica e é termolábil (100°C por 30 min). A proteína flagelar (flagelina, uma subunidade do filamento helicoidal que forma o flagelo) carrega os fatores antigênicos determinantes do grupo H

(RATINER, 1998). O antígeno capsular (K) é definido como um polissacarídeo capsular ou microcapsular que envolve a parede celular, independentemente do antígeno O. Foram reconhecidos até o momento 173 antígenos O, 56 antígenos H e 80 antígenos K, que podem gerar inúmeros sorotipos O:H:K (BRITO et al., 2004).

Os grupos e tipos sorológicos de *E. coli* são identificados por meio de anticorpos preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, antígenos O,H e K. O antígeno O identifica o sorogrupo da bactéria e a combinação entre os antígenos O e H define o sorotipo. No entanto, nem todas as *E. coli* apresentam os três tipos ao mesmo tempo (MENG, FENG, DOYLE, 2001; CAMPOS, FRANZOLIN, TRABULSI, 2004). Este esquema O:H:K estabelecido por Kauffmann em 1947, possibilitou um grande avanço na identificação de *E. coli* e, pela aplicação deste sistema, verificou-se que *Bacterium coli neapolitanum* pertencia ao sorogrupo O111 (BERTÃO, SARIDAKIS, 2007). Diferentes sorotipos de *Escherichia coli* têm sido relacionados com surtos de toxinfecções alimentares, sendo classificados de acordo com suas propriedades de virulência; sorotipos O:H; interações com a mucosa intestinal e síndrome clínica (NATARO, KAPER, 1998; CLARKE, 2001).

As linhagens de *E. coli* capazes de provocar doença são classificadas como patógenos intestinais e extra-intestinais, segundo o local de isolamento. *Escherichia coli* causadoras de diarreias são classificadas em várias categorias de acordo com as características de virulência que incluem produção de toxinas, capacidade de invasão e a adesão às células do hospedeiro, manifestações clínicas, epidemiologia e sorotipagem (LIOR, 1994; BUCHANAN, DOYLE, 1997).

As principais categorias diarreio gênicas de *Escherichia coli* são: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EA_gEC), *Escherichia coli* com aderência difusa (DAEC) e *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC). A patogenicidade desses grupos consiste na colonização da mucosa intestinal, evasão da defesa do hospedeiro, multiplicação e dano celular (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004; SILVA, SILVA, 2006). As *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) utilizam diferentes estratégias para provocar infecção, consequência da versatilidade de seu genoma que é conferida principalmente por duas configurações genéticas: plasmídeos de

virulência localizados no cromossomo, além da presença de bacteriófagos (EKLUND, LEINO, SIITONEN, 2002).

3.5.1. *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

As EPEC são *Escherichia coli* diarreiogênicas que produzem uma característica histopatológica conhecida como fenômeno de ligação e desaparecimento (A/E) (*Attaching and Effacing*) sobre células intestinais, no entanto, não produzem Shiga ou verotoxinas. A *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) é a principal responsável por diarreias em crianças com menos de um ano de idade principalmente em países em desenvolvimento (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004). Esse grupo de *E. coli* recebe frequentemente a denominação de *E. coli* enteropatogênica clássica, por terem sido as primeiras *E. coli* implicadas em diarreia (PADHYE, DOYLE, 1992).

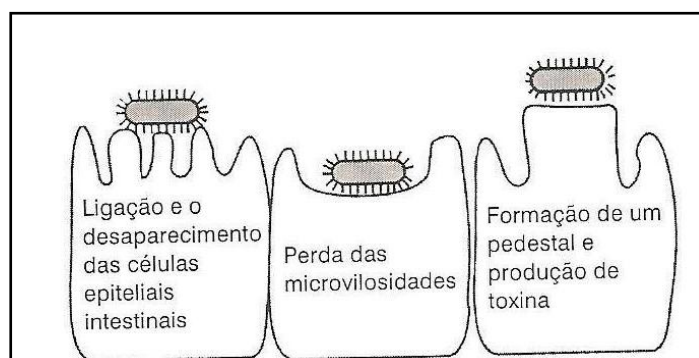
Estudos epidemiológicos demonstram que EPEC foram responsáveis por casos de diarreia em crianças na Cidade do México e no Chile (LEVINE et al., 1993). Os principais sintomas clínicos da doença provocada pelos sorotipos de EPEC são diarreia aquosa e sanguinolenta acompanhada de febre, mal-estar e vômitos (MANGIA et al., 1993). A dose infectante segundo Bell e Kyriakides (1998) é estimada entre 10^5 - 10^8 células. A EPEC é transmitida pela ingestão de água e alimentos contaminados. A antibioticoterapia é quase sempre desnecessária, porém quando necessária deve-se primeiro fazer um antibiograma, para se confirmar o antibiótico mais eficiente (FAGUNDES-NETO, SCALETSKY, 2000; SILVA, SILVA, 2006).

A organização Mundial de Saúde reconheceu, em 1989, doze sorogrupos O de EPEC, designados: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158. Nesses sorogrupos estão incluídas linhagens de EPEC típicas e atípicas, *E. coli* enteroagregativas, além de outras variantes de *E. coli* causadoras de diarreia (RODRIGUES et al., 1996). Os sorotipos de EPEC mais frequentemente encontrados são: O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6, O142:H34 (EPEC típicas) e O126:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2 (EPEC atípicas)

(TRABULSI et al., 2002). Esses dados foram recolhidos de estudos análogos realizados em São Paulo, Rio de Janeiro, Reino Unido e na Itália (CAMPOS et al., 1994; GIAMMANCO et al., 1996; SCOTLAND et al., 1996; ROSA et al., 1998).

De acordo com Pearce et al., (2006) as *E. coli* enteropatogênicas são importantes patógenos de humanos e animais. Os sorogrupos O26, O103, O111 e O145 são de elevada significância no que se refere à causa de doenças em humanos, os quais são frequentemente associados a sérias infecções em humanos. *E. coli* O26 foi o sorogrupo com maior frequência de isolamento a partir de infecções causadas por *E. coli* em humanos na Espanha (BLANCO, BLANCO, RAMOS, 1994) e na Finlândia (KESKIMAKI et al., 1998).

A EPEC clássica é caracterizada em função do seu padrão de adesão localizada (LA) (*Localized Adhesion*) em células epiteliais. Logo após o contato inicial entre a EPEC e a célula alvo com formação de LA, seguem-se estágios que levam ao estabelecimento da lesão celular, denominada de fenômeno de ligação e desaparecimento (A/E) (*Attaching and Effacing*) em células HEP-2, HeLa e no epitélio intestinal (Figura 7). Assim que a EPEC adere à superfície da célula epitelial, formam-se colônias de bactérias que a seguir se dispersam. Esta lesão é caracterizada pelo desaparecimento (destruição) das microvilosidades intestinais e rearranjo do citoesqueleto celular, culminando na formação de uma estrutura semelhante a um pedestal onde a bactéria permanece intimamente ligada (KNUTTON et al., 1999).

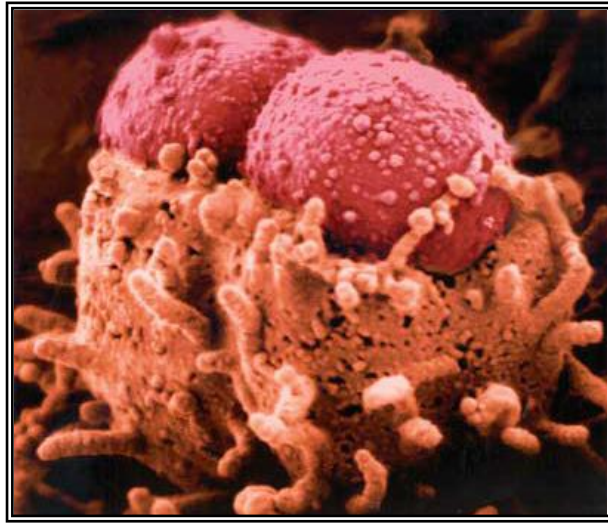


Fonte: Forsythe, (2002).

Figura 7. Infecção das células da mucosa intestinal causada por *E. coli* EPEC

O pedestal (Figura 8) exerce papel efetivo na adesão de EPEC à superfície da célula do hospedeiro. Este se constitui em uma estrutura desenvolvida

pela bactéria para permanecer no ambiente extracelular e não ser internalizada se, eventualmente aderir à superfície de fagócitos (GOOSNEY et al., 1999).



Fonte: Kaper, Nataro, Mobley, (2004).

Figura 8. Formação do pedestal produzido durante o processo infeccioso causado por *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

Os genes envolvidos na formação da lesão A/E estão presentes em uma ilha de patogenicidade denominada locus de desaparecimento dos enterócitos (*Locus of Enterocyte Effacement*) (LEE). Essa ilha também conhecida como região LEE é subdividida em cinco operons, denominados LEE 1, LEE2, LEE3, LEE4 e *tir* (ou LEE5) (ELLIOT et al., 1998). A região LEE codifica um sistema de secreção do tipo III (JARVIS et al., 1995), a adesina não fímbria intimina (JERSE et al., 1990) e o próprio receptor da intimina, a proteína “Translocated intimin receptor” (*tir*) (KENNY et al., 1997), a qual é translocada para a célula hospedeira pelo sistema de secreção do tipo III. A interação intimina-*tir* permite a ancoragem da EPEC na superfície da célula hospedeira, inicia processos de sinalização celular e reorganiza os componentes do citoesqueleto para formar o pedestal (GOOSNEY et al., 2000).

A intimina é uma proteína de 94 kDA, codificada pelo gene *eae*, que se expressa na membrana externa da bactéria. Já foram descritos quatro subtipos de intimina: α , β , γ e δ . Cada um deles pode estar relacionado como a progressão tecidual da bactéria para diferentes regiões do intestino (PHILLIPS, FRANKEL, 2000).

Donnenberg e Kaper (1992) sugeriram um modelo em três estágios da infecção de EPEC. O primeiro estágio (aderência localizada) envolve uma interação

íntima da bactéria com a superfície da célula hospedeira, mediada por uma fímbria do tipo IV, expressas na superfície bacteriana e denominadas *bfp* (*bundle-forming-pilus*) um importante fator de virulência de EPEC (GIRÓN, HO, SCHOOLNIK, 1991). O *bfp* é um conjunto de 14 genes que faz parte de um plasmídeo de 60 MDa denominado *eaf* ("EPEC Adherence factor") (STONE et al., 1996). Fímbrias do tipo IV são estruturas filamentosas de 4 a 7nm de diâmetro que se agregam para formar feixes (BIEBER et al., 1998). Pilis semelhantes são expressos por outras bactérias patogênicas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* e *Neisseria gonorrhoeae*, estruturas importantes nas interações dessas bactérias com as células hospedeiras (STROM, LORY, 1993; MANNING, MEYER, 1997).

O segundo estágio (transdução de sinais) envolve um aparato de secreções do tipo III, que induz a secreção de proteínas de EPEC, chamadas Esps ("*E. coli* Secreted Proteins"), sendo elas: EspA, EspB, EspD, EspF, EspG, Map e *tir*, sendo que EspA, B e D são componentes do aparato de secreções (JARVIS et al., 1995). Poucas funções destas proteínas são conhecidas em detalhes. De uma forma geral, elas desencadeiam a transdução de sinais em cascata nas células hospedeiras, levando a um rearranjo dos componentes do citoesqueleto. Os genes responsáveis pela codificação destas proteínas estão inseridos na região LEE (KENNY, FINLAY, 1995; ELLIOT et al., 1998).

O terceiro estágio (aderência íntima) envolve a atividade do gene cromossômico *eae*, que expressa à proteína intimina, responsável pelo contato íntimo entre a bactéria e a célula epitelial. O acúmulo de filamentos de actina e outras proteínas do citoesqueleto como - actina, talina, miosina e ezerina formam o pedestal (FINLAY et al., 1992).

As linhagens de EPEC são divididas em dois grupos: EPEC típicas (presença de gene *eae* e plasmídeo *eaf*) e EPEC atípicas (presença somente do gene *eae*). As EPEC típicas, ou simplesmente EPEC, são bastante homogêneas em suas propriedades de virulência, uma vez que expressam basicamente os fatores de virulência codificados pela região LEE e pelo plasmídeo *eaf*. Por outro lado, as EPEC atípicas não são portadoras do plasmídeo *eaf*, mas possuem o gene *eae* e demais fatores de virulência codificados na região LEE. As EPECs típicas e atípicas também diferem no padrão de adesão em células (TRABULSI et al., 1996). A maioria das linhagens atípicas de EPEC já foi isolada de diferentes espécies de animais, ao contrário das típicas, que segundo os dados até agora disponíveis, têm

apenas os seres humanos como reservatório (ROTTNER, STRADAL, WEHLAND, 2005).

Segundo Trabulsi et al., (2002), foi reportado no Brasil, um declínio na frequência de EPEC típicas e aumento no isolamento de cepas atípicas, achados resultados que coincidem com a diminuição nos casos de diarreias em algumas regiões. Essa mesma situação já havia sido observada nos Estados Unidos e países da Europa. Provavelmente a diarreia causada por EPEC resulta de múltiplos mecanismos, incluindo secreção de íons, aumento da permeabilidade intestinal, inflamação intestinal e perda de absorção de nutrientes devido à lesão A/E (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

3.5.2. *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)

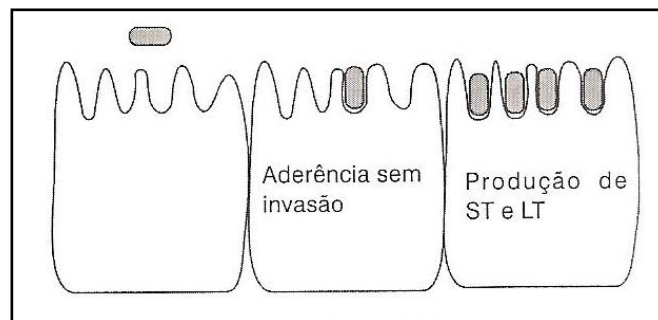
A importância deste grupo como uma das principais causas de diarreia foi reconhecida na década de 1960 e a partir desta década, um grande número de informações sobre epidemiologia e patogênese das *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) tem sido acumulado (GUTH, 2000).

As *E. coli* ETEC causam diarreia aguda em humanos e outros animais em todo mundo, sendo responsáveis pela alta mortalidade infantil em países em desenvolvimento. A ETEC é geralmente associada à "diarreia do viajante" e os sintomas são similares aos da cólera: diarreia aquosa, desidratação, possivelmente choque, e algumas vezes vômito. A dose infectante é considerada alta, estando entre 10^6 e 10^8 células. O período de incubação varia de 8 a 44 horas, com média de 26 horas e a duração da doença é curta, aproximadamente 24 a 30 horas (GONÇALVES, MARQUES, LUCCA, 2002).

E. coli ETEC produz pelo menos duas enterotoxinas diferentes que irão agir no intestino delgado estimulando enzimas envolvidas na manutenção do equilíbrio hidrossalino da mucosa intestinal. Esse estímulo resulta em uma menor absorção de sódio pelas células das microvilosidades intestinais e maior excreção de cloretos e bicarbonatos, com conseqüente acúmulo de líquido no lúmen intestinal. Não ocorre invasão nem dano à camada epitelial do intestino delgado, apenas

ocorrem à colonização e produção de toxinas (Figura 9) (PADHYE, DOYLE, 1992; SHUTERLAND, BAYLISS, BRAXTON, 1995; TAUSCHEK et al., 2002).

A infecção por ETEC ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminados, as quais, chegando ao aparelho digestivo, colonizam a porção distal do intestino delgado e produzem enterotoxinas responsáveis pela síndrome diarréica. As enterotoxinas produzidas por este grupo de *E. coli* pertencem a classe de toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST), que se diferenciam na estrutura, antigenicidade e mecanismos de ação (SEARS, KAPER, 1996).



Fonte: Forsythe, (2002).

Figura 9. Infecção da mucosa intestinal por *E. coli* ETEC

A enterotoxina termolábel possui estrutura e função semelhante à toxina colérica (TC) do *Vibrio cholerae* (SIXMAR et al., 1993) sendo dividida em duas subclasses: LT-I e LT-II. A toxina LT-I é expressa por amostras de *E. coli* que são patogênicas para o homem e outros animais, principalmente suínos, enquanto que a LT-II é encontrada principalmente em bovinos e raramente em humanos. A primeira é uma proteína oligomérica de 85kDa, composta de cinco subunidades B e uma subunidade A. As subunidades B ligam-se ao intestino por meio do receptor GM1, enquanto a subunidade A é responsável pela atividade enzimática da toxina (TENENBERG et al., 1994; MENG, FENG, DOYLE, 2001). A ação desta toxina é estimulada pela enzima adenil-ciclase, promovendo uma elevação dos níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) nos enterócitos, o que leva à perda de potássio e íons bicarbonato pela célula, com conseqüente secreção de líquido para o intestino causando a diarréia (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

As enterotoxinas termoestáveis (STa e STb) são capazes de resistir ao tratamento térmico a 100°C por 30 minutos, sendo que STa, também denominada por alguns autores de ST-I, apresenta peso molecular de aproximadamente 2kDa, é

solúvel em água e em solventes orgânicos, além de ser resistente à ação de enzimas proteolíticas. Por outro lado, a enterotoxina STb, também denominada de ST-II, tem peso molecular de 5 kDa, é insolúvel em metanol, estimula a secreção intestinal por um mecanismo que não envolve alterações das concentrações de nucleotídeos cíclicos, mas eleva concentrações citossólicas de Ca^{2+} , estimula a liberação de prostaglandina E2 e estimula a liberação de serotonina, mecanismos que permitem aumento de secreção de íons com conseqüente diarreia (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

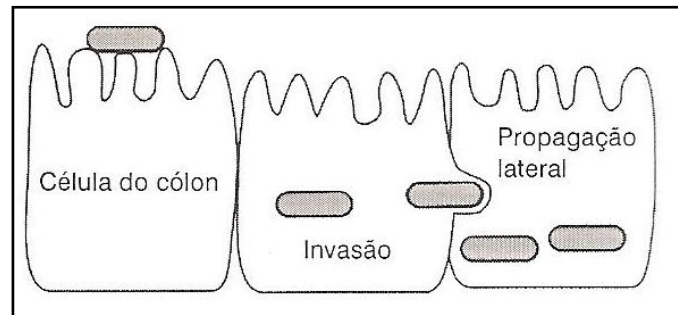
Pesquisas realizadas por Henderson e Nataro (2001) indicam que as ETEC, similarmente a outras classes diarreiogênicas, possuem genes de virulência codificadores das toxinas e fatores de adesão. Incluído nestes genes está o *tibA*, o qual codifica uma adesina membro da família das proteínas autotransportadoras, que exercem diferentes papéis na patogênese bacteriana.

3.5.3. *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC) compreende um grupo de bactérias conhecido pela capacidade de invadir células. Este grupo provoca disenteria semelhante à causada por *Shigella dysenteriae* (TRABULSI et al., 2002). A diarreia aquosa pode ser indistinguível das diarreias observadas em ETEC. Apenas uma minoria dos pacientes desenvolve a síndrome disentérica caracterizada por sintomas como febre, dores abdominais, mal-estar e diarreia aquosa com sangue e muco. O período de incubação varia entre oito e vinte e quatro horas (média de 11 horas) e a dose infectante é entre 10^6 a 10^8 células. As infecções causadas por EIEC ocorrem geralmente pela ingestão de água ou alimentos contaminados (GONÇALVES, MARQUES, LUCCA, 2002).

A infecção provocada pela *E. coli* EIEC é resultante da invasão das bactérias nas células da mucosa intestinal, e conseqüente penetração nas células adjacentes (Figura 10). A intensa proliferação dentro dessas células, é que leva a sua morte. Não há produção de nenhum tipo de toxina. Como nas shigeloses, a infecção causada por EIEC consiste em inflamação e necrose da mucosa do colon (intestino grosso). Clinicamente, as infecções se manifestam por diarreia

sanguinolenta ou não, com a presença de leucócitos e muco, geralmente acompanhada de dores abdominais e febre. As infecções por EIEC são mais frequentes em crianças maiores de dois anos e em adultos. A característica de invasividade, tanto da EIEC como da *Shigella*, está associada à presença de plasmídeos (PADHYE, DOYLE, 1992).



Fonte: Forsythe, (2002).

Figura 10. Infecção da mucosa por *E. coli* EIEC

A *E. coli* EIEC pode ser caracterizada por seus antígenos O, sendo os mais frequentes: O21, O28ac, O29, O112c, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167 e O173, pela ausência do antígeno flagelar, por apresentar teste da descarboxilação da lisina negativo e pela não fermentação da lactose ou fermentação tardiamente (ORSKOV et al., 1991; HOBBS, ROBERTS, 1998).

A expressão dos fatores de virulência de EIEC depende de genes cromossomais e plasmidiais. Os genes necessários para invasão estão contidos em um plasmídeo de 140 MDa, chamado plnv, necessário para a expressão de múltiplas proteínas necessárias à patogenicidade de EIEC (ANDREWS et al., 1991; NATARO, KAPER, 1998).

As EIEC invadem o intestino pelas células M do sistema linfático específico da mucosa, com subsequente formação de vesículas denominadas vacúolos endocíticos. Em seguida, ocorre lise desses vacúolos e alterações do citoesqueleto celular que culminam no movimento bacteriano. Este movimento, que ocorre dentro do citoplasma da célula hospedeira é mediado pela nucleação da actina celular em uma espécie de “cauda” que se forma em um dos pólos da bactéria (ADAM et al., 1995). Posteriormente, mais actina é adicionada à cauda, o que “impulsiona” a bactéria pelo citoplasma, geralmente na direção lateral, até alcançar a célula adjacente na membrana citoplasmática (PREVOST et al., 1992).

A invasão da mucosa por EIEC provoca intensa reação inflamatória tecidual e disentérica e, embora a EIEC seja invasiva, sua disseminação pela submucosa é rara (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004). Muitas destas características da patogênese de EIEC resultam dos múltiplos efeitos do sistema de secreção tipo III que secreta as proteínas IpaA, IpaB, IpaC e IpaD, as quais são mediadoras de eventos de sinalização e rearranjos do citoesqueleto (TRAN VAN NHIEU et al., 2000). As infecções por EIEC costumam extinguir-se naturalmente, no entanto, quando necessária a administração de antibióticos indica-se a ampicilina (PADHYE, DOYLE, 1992).

3.5.4. *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)

As *E. coli* EHEC foram descritas pela primeira vez em 1977, sendo reconhecidas como causadoras de doenças em humanos e animais em 1982, quando foi implicada em dois surtos de colite hemorrágica (MEAD, GRIFFIN, 1998). Foi verificado que a *E. coli* O157:H7 evoluiu a partir da EPEC a qual adquiriu os genes da toxina da *Shigella dysenteriae* via um bacteriófago, surgindo um patógeno emergente. Acredita-se que esta categoria diarreiogênica seja responsável por mais de 90% de todos os casos de síndrome urêmica hemolítica (HUS) em países industrializados (FORSYTHE, 2002).

A classe de *E. coli* EHEC também é conhecida como *E. coli* verotoxigênica (VTEC) ou *E. coli* produtora de shigatoxina (STEC). A denominação EHEC é utilizada preferencialmente para os sorotipos que causam doenças em seres humanos especialmente a colite hemorrágica (HC) e a síndrome hemolítica urêmica (HUS), sendo a EHEC O157:H7 a mais importante entre os sorotipos (KUHNER, BOERLIN, FREY, 2000).

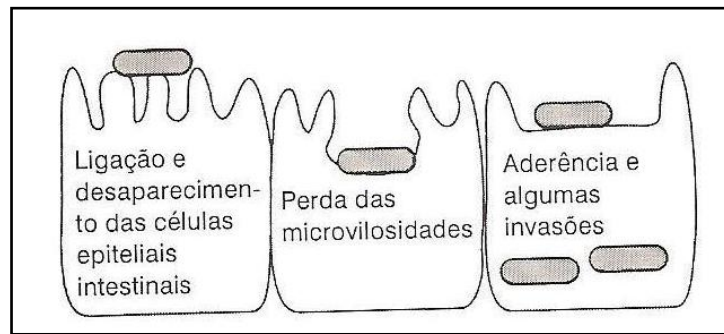
O período de incubação para a diarreia causada pela EHEC normalmente é de 3 a 4 dias, no entanto, pode ser mais longo (de 5 a 8 dias) ou mais curto (de 1 a 2 dias). Adultos saudáveis sofrem de púrpura trombótica trombocitopênica (TTP), na qual as plaquetas sanguíneas envolvem os órgãos internos, conduzindo a danos nos rins e no sistema nervoso central. As pessoas mais vulneráveis da população, crianças e idosos, acometidas pela TTP, podem desenvolver a colite hemorrágica

(HC), doença que pode conduzir a síndrome urêmica hemolítica (HUS) (GONÇALVES, MARQUES, LUCCA, 2002).

A HC é uma forma de infecção menos grave do que a HUS, ambas causadas pela *E. coli* O157:H7. O primeiro sintoma da HC é o repentino aparecimento de graves dores abdominais. Cerca de 24 horas depois, uma diarreia aquosa não-sanguinolenta se inicia. Algumas vítimas sofrem de febre de curta duração. Vômitos ocorrem em mais ou menos metade dos pacientes durante o período da diarreia e/ou em outros momentos da enfermidade. Após 1 ou 2 dias a diarreia torna-se sanguinolenta, e o paciente passa a ter um aumento das dores abdominais. Na maioria dos pacientes a diarreia sanguinolenta não tem longa duração. Infelizmente, 2 a 7% dos pacientes (chegando até a 30% em alguns surtos) progredirão para a HUS e complicações subseqüentes. Na HUS, o paciente sofre de diarreia severa, anemia hemolítica, distúrbios e falhas renais, o que requer diálises e transfusões de sangue. Os distúrbios nervosos centrais podem aparecer, os quais levam a convulsões, coma e morte. A taxa de mortalidade é de 3 a 17% (FORSYTHE, 2002).

Nos países desenvolvidos têm sido relatados com freqüência casos de HC e HUS como complicações posteriores ao contato com EHEC, principalmente por aquelas do sorotipo O157:H7 (PATON, PATON, 1998). Aproximadamente de 5 a 10% das pessoas que sofrem uma infecção por EHEC pode desenvolver HUS, e deste grupo, aproximadamente 10% podem chegar a morrer ou ficar com alguma seqüela renal permanente (THORPE, 2004).

Devido à associação inicial de O157:H7 com colite hemorrágica, as linhagens pertencentes a este sorotipo foram denominadas *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) e, por muitos anos, EHEC permaneceu como sinônimo de *E. coli* O157:H7, agente etiológico de HC. Atualmente, a designação de EHEC é atribuída as *E. coli* que produzem Stx e causam uma lesão histopatológica denominada de ligação e desaparecimento (A/E) (Figura 11), o mesmo fenômeno realizado por EPEC, porém outros sorotipos com capacidade de produzir “Shiga like toxins” (SLT) foram incluídos no grupo das *E. coli* EHEC, tais como: O26:H11, O111:H8, O55:H7, O103:H2, O113:H21 e O104:H21, que também causam diarreias e são mais frequentes que a O157:H7 em muitos países (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004; MAINIL, DAUBE, 2005).



Fonte: Forsythe, (2002).

Figura 11. Infecção das células da mucosa intestinal por *E. coli* EHEC

Os surtos causados por EHEC se devem principalmente a alimentos de origem animal. O principal reservatório de EHEC descrito é o gado bovino, no entanto, estudos epidemiológicos revelam uma prevalência de linhagens de EHEC no trato gastrointestinal de outros animais incluindo ovelhas, porcos, cabras, cachorros e gatos (BEUTIN et al., 1993).

Algumas epidemias causadas por EHEC O157:H7 foram ligadas ao consumo de hambúrguer mal cozido ou carnes fermentadas como os salames e piperones. Embora a ingestão de alimentos de origem animal mal cozidos seja a principal rota de transmissão de EHEC para humanos, outros alimentos sujeitos à contaminação por fezes bovinas no cultivo e/ou produção também são potencialmente perigosos, como frutas e vegetais crus, maionese, suco de maçã e leite não pasteurizado (MORGAN et al., 1993; PATON, PATON, 1998). Há evidência de que estas infecções possam ser adquiridas por transmissão pela água de consumo, recreação e contato com animais em fazendas (GRIFFIN, TAUXE, 1991; HEUVELINK et al., 2002). A dose infectante para estes organismos é estimada em 10 células viáveis (STRACHAN et al., 2005).

O maior surto de EHEC relatado até 1997, envolvendo o consumo de vegetais, ocorreu na cidade de Sakai, Japão, devido ao consumo de brotos de rabanete crus contaminados. Deles resultaram mais de 6.000 casos de HC e mais de 100 casos de HUS (SWINBANKS, 1996).

Assim como a EPEC, a *E. coli* O:157:H7 pode aderir ao epitélio intestinal e produzir a característica lesão A/E. Jarvis e Kaper (1996) demonstraram que as EHEC produzem intimina que também é codificada pelo gene *eae*. Acredita-se que os fatores de virulência adicionais desta bactéria tenham sido adquiridos por

transferência horizontal e recombinação gênica (LECLERC et al., 1996). O principal fator de virulência das EHEC é a produção das toxinas Shiga (Stx), extremamente potentes e responsáveis por muitos dos sintomas observados nas doenças causadas por esse sorotipo (NATARO, KAPER, 1998).

Existem quatro subgrupos de verotoxinas: VT1 ou SLT1, VT2 ou SLT2, VT2c ou SLT1c e VT2e ou SLT1e. Essas toxinas receberam essa denominação por causarem efeito citopático irreversível em células Vero (células de rim de macaco verde africano) e apresentam dois grupos principais imunologicamente distintos e não passíveis de reações cruzadas chamados *stx1* e *stx2*. A EHEC pode expressar uma ou ambas as toxinas Shiga ou ainda múltiplas formas da *stx2*, contudo esta toxina isoladamente, não é suficiente para causar doenças e, outros fatores são considerados relevantes, como a presença do plasmídeo pO157, o qual contém o gene *ehxA* ou *hlyA* que codifica uma hemolisina chamada entero-hemolisina e a produção de adesinas fimbriais (SCHMIDT, KERNBACH, KARCH, 1996; NATARO, KAPER, 1998; PATON, PATON, 1998).

A toxina *stx1* é indistinguível da Shiga toxina produzida por *S. dysenteriae*; já *stx2* é uma molécula mais divergente com 56% de homologia de aminoácidos com a toxina acima mencionada (MEAD, GRIFFIN, 1998). De acordo com as pesquisas realizadas por Griffin (1995) as linhagens de *E. coli* produtoras de *stx2* estão mais relacionadas com o desenvolvimento de HUS. As Stxs são produzidas no cólon e levadas pela corrente sanguínea até aos rins, causando danos ao endotélio vascular e o fechamento dos microvasos em função de uma combinação de toxicidade direta e indução de inflamação local os quais podem levar à HUS (ANDREOLI et al., 2002).

O sorotipo EHEC é relativamente raro no Brasil, no entanto, outras EHEC têm sido isoladas em fezes de animais ou de casos de diarreias. Desde a década de 80, já foram isoladas *E. coli* dos sorotipos O26:H11, O111:H-, O111:H2, O119:H6 de fezes de pacientes com diarreia, mas poucos foram as linhagens em que foi detectado o gene para a *stx* e ainda mais rara a detecção da produção de toxinas (GUTH et al., 2002). Ainda no Brasil, também foi detectada a presença de linhagens de EHEC O157:H7 em fezes de animais e carne bovina (GUTH et al., 2003; MOREIRA et al., 2003).

De acordo com os registros do Centro de Vigilância Epidemiológica/SP, no Brasil, foram notificados 12 casos de HUS no estado de São Paulo no período de

1998/2000, com históricos anteriores de diarréias e possível, porém não confirmado, envolvimento com *E. coli* O157:H7 (BRASIL, 2001). O primeiro relato de isolamento de *E. coli* produtora de shiga toxina (STEC) em paciente com HUS ocorreu em um hospital da cidade de São Paulo no ano de 2001 onde, uma criança com histórico de diarréia aguda ocorrida três semanas antes da internação e cujos sintomas clínicos e resultados de exames laboratoriais levaram ao diagnóstico desta síndrome (GUTH et al., 2002). A linhagem de *E. coli* isolada pertencia ao sorotipo O26:H11. Vaz et al. (2004) analisando uma coleção de 39 culturas de STEC isoladas de pacientes humanos com diarréia no período de 1976 a 1999, em São Paulo, Brasil, detectou a predominância dos sorogrupos O111 e O26. Os sorotipos encontrados foram: O26:H11, O55:H19, O93:H19, O111:NM, O11:H11, O118:H16 e O157:H7.

Embora o sorotipo O157:H7 esteja ligado à maioria dos surtos associados a STEC descritos mundialmente, estudos recentes indicam que a incidência deste sorotipo vem diminuindo substancialmente. Em contraste, STEC não-O157 vem sendo isolada com maior frequência a partir de amostras fecais de pacientes com HUS (JAEGER, ACHESON, 2000; BANATVALA et al., 2001), entre os quais estão os sorogrupos O26, O91, O103, O111 e O113 (NATARO, KAPER, 1998; PATON, PATON, 1998). No Brasil, poucas linhagens de *E. coli* O157:H7 foram isoladas de humanos (IRINO et al., 2002).

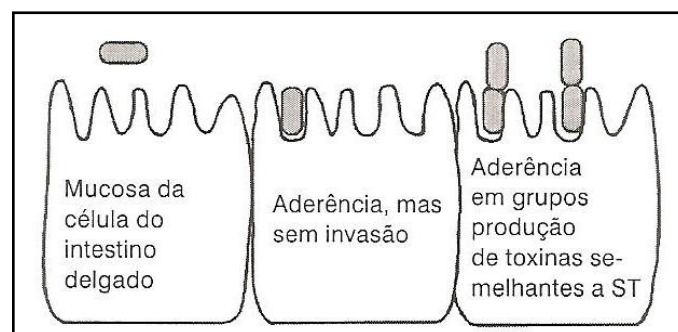
3.5.5. *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC/ EAggEC)

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é reconhecida como um patógeno emergente que causa diarréia em crianças e adultos em todo o mundo. Em pesquisas recentes foi detectado o envolvimento da EAEC em casos de diarréia persistente, principalmente em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (BERNIER, GOUNON, BOUGUÉNEC, 2002). As *E. coli* EAEC são frequentes tanto nas fezes de crianças saudáveis quanto nas com diarréia aguda, no entanto alguns pesquisadores têm encontrado uma associação das EAEC com diarréia de duração de 7 a 14 dias (DOYLE, CLIVER, 1990). A primeira descrição e identificação dessa bactéria ocorreu em 1987 no Chile, a partir de uma criança com diarréia persistente (NATARO, 2005).

A principal característica da EAEC é sua capacidade de aderência em células epiteliais HEP-2 e HeLa, denominado adesão agregativa (AA) ou “stacked brick”. Neste padrão, as bactérias dispõem-se lado a lado, formando agregados heterogêneos que lembram tijolos empilhados ou distribuindo-se em forma de cordões, tanto nas superfícies celulares como nas lamínulas de suporte, em regiões livres de células. Esta característica permite que se diferenciem as *E. coli* enteroagregativas (EAEC) das enteropatogênicas (EPEC) e de aderência difusa (DAEC) (NATARO, LEVINE, 1994).

Segundo Savarino et al., (1996) e Forsythe (2002) algumas linhagens de EAggEC são conhecidas por produzirem uma toxina do tipo shigatoxina. Outra característica da EAggEC é o fato de ter a superfície hidrofóbica e essa característica parece estar associada à uma camada superficial densa em elétrons e à presença de uma proteína de 38 kDa não encontrada em qualquer outra linhagem de *E. coli* (WAI, TAKADE, AMAKO, 1996).

As *E. coli* enteroagregativas são similares às linhagens ETEC quanto ao fato de poderem ligar-se às células do intestino delgado, de não serem invasivas e de não causarem alteração histológica óbvia nas células intestinais a que se aderem (Figura 12). Elas diferem das ETECs principalmente pelo fato de não aderirem uniformemente à superfície da mucosa intestinal, ao invés disso, elas tendem a aglomerar-se em pequenos grupos (FORSYTHE, 2002).



Fonte: Forsythe, (2002).

Figura 12. Infecção da mucosa intestinal por *E. coli* EAEC

As EAEC são heterogêneas tanto pelos sintomas desenvolvidos pelas pessoas infectadas, quanto pelos genes de virulência. A maioria dos estudos sugere que a infecção resultante da ação das *E. coli* EAEC seja gastrintestinal. Os sintomas mais comumente relatados são diarreia aquosa, com ou sem sangue e muco, dor

abdominal, náuseas, vômitos e febre. EAEC pode causar diarreias agudas e crônicas (> 14 dias), apresentando um período de incubação que varia entre 8 a 18 horas. As variações dos sintomas clínicos da infecção por EAEC são devido a fatores, tais como: susceptibilidade genética do hospedeiro, resposta imunológica, heterogeneidade de virulência entre os sorotipos de EAEC e quantidade de bactérias ingeridas pelo hospedeiro infectado (HUANG et al., 2006).

De uma forma geral, a patogênese de EAEC envolve três estágios, a saber: 1. Aderência inicial na mucosa pelas fímbrias agregativas e outros fatores de colonização; 2. Produção de uma camada de muco, provavelmente produzido pela bactéria e pela mucosa intestinal. Neste estágio, a EAEC adere à mucosa intestinal e estimula a secreção de muco formando uma espécie de biofilme. Este biofilme incrusta-se na mucosa e facilita a permanência de EAEC na superfície dos enterócitos (TZIPORI et al., 1992; HICKS, CANDY, PHILLIPS, 1996; HUANG, DUPONT, 2004). Isto pode ser a explicação para alguma das características clínicas da diarreia provocada por este grupo, que inclui presença de muco nas fezes e diarreia prolongada (mais de 14 dias) (HENDERSON et al., 1999); 3. Produção de toxinas com intensa resposta inflamatória, a qual acarreta na liberação de citocinas (principalmente a IL-8) que causam toxicidade na mucosa e secreção intestinal (GREENBERG et al., 2002). Entre os sorotipos pertencentes à categoria de *E. coli* enteroagregativa associados a surtos estão: O86:H2, O111:H4, O111:H10, O111:H12, O111:H21, O125:H16, O125:H21, O126:H27, O128:H12 e O128:H35 (ELIAS et al., 2002).

3.5.6. *Escherichia coli* de Aderência Difusa (DAEC)

E. coli pertencentes a esse grupo são identificadas pelo seu padrão de aderência difusa em culturas de células epiteliais “in vitro” e foram reconhecidas como a sexta classe de *E. coli* diarreiogênica (NATARO, KAPER, 1998).

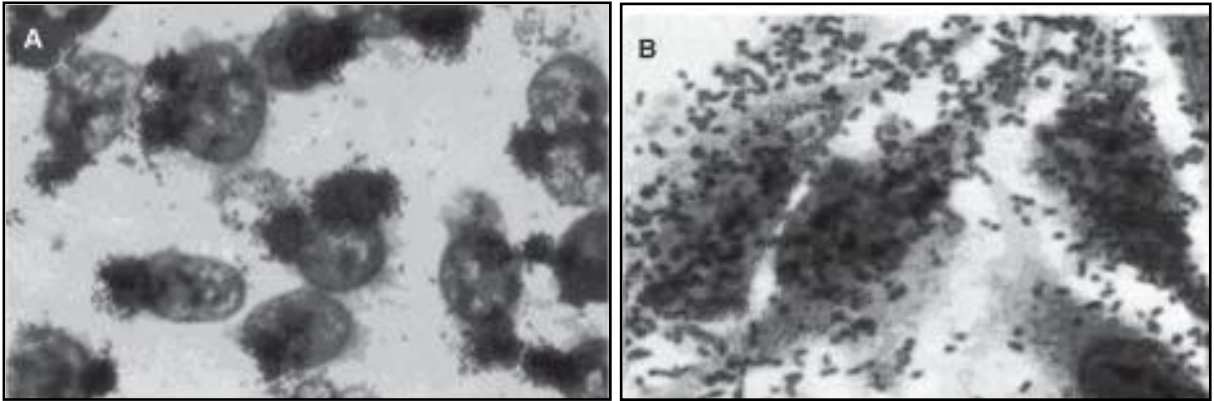
Em algumas pesquisas a *E. coli* de aderência difusa (DAEC) foi implicação como agente de diarreias. Porém, têm-se relatos da presença de linhagens pertencentes a este grupo, com maior frequência, em pacientes assintomáticos do que em pacientes com quadros de diarreia. Uma associação de

DAEC com diarreia foi detectada em crianças com cerca de cinco anos de idade. Nesta pesquisa foi mostrado que o risco relativo de diarreia associada à DAEC aumenta com a idade (LEVINE et al., 1993; GOMES et al., 1998). Na França, a DAEC foi prevalente em casos de diarreia em pacientes hospitalizados, não havendo outro enteropatógeno identificado, sugerindo que DAEC pode ser um importante patógeno em países desenvolvidos (JALLAT et al., 1993).

Pouco se sabe sobre seu mecanismo de patogenicidade, porém, várias estruturas envolvidas na virulência desse grupo são relatadas. De fato, quatro adesinas relacionadas com o fenótipo de aderência difusa estão bem caracterizadas: F1845 (BILGE et al., 1989), Aida-I (BENZ, SCHMIDT, 1992), CF16k (JALLAT et al., 1994), e uma proteína de 57kDa (YAMAMOTO, ECHEVERRIA, 1996). Contudo, não há dados suficientes para confirmar o papel dessas adesinas na diarreia (TADDEI et al., 2003).

A F1845 caracterizada em 1989 é a fímbria responsável pelo fenótipo de aderência difusa das DAEC (BILGE et al., 1989; NOWICKI et al., 1990). O gene que codifica a F1845 é o *daaE* e está presente tanto no cromossomo da bactéria como nos plasmídeos e apresenta homologia com os membros da família de adesinas Afa/Dr (NOWICKI et al., 1990). Benz e Schimidt (1992) descreveram um gene denominado Aida-I que gera uma proteína de 100kDa, sugerindo que este fator também estaria associado ao fenótipo de aderência difusa, mas só é observado em um pequeno número de DAEC.

O fenômeno de aderência difusa também parece estar associado a uma proteína localizada na membrana externa da bactéria, a qual foi encontrada no sorotipo O126:H27 pertencente ao grupo das DAEC. Os genes que codificam essa proteína já foram sequenciados, porém, foram encontrados em apenas algumas linhagens de DAEC isoladas (RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002). Yamamoto e Echeverria (1996) relataram que uma *E. coli* não portadora da fímbria F1845, continha uma proteína de 57kDa, que seria a responsável pela aderência difusa e também pela capacidade de hemaglutinação. Na Figura 13 encontra-se um exemplo de dois tipos de aderência apresentado por diferentes grupos de *E. coli* patogênicas.



Fonte: Campos, Franzolin, Trabulsi, (2004).

Figura 13. Exemplos de padrões de aderência: (A) padrão de aderência localizada, expressa por uma *E. coli* EPEC; (B) padrão de aderência difusa apresentada por *E. coli* DAEC.

As DAEC podem provocar efeitos citopáticos caracterizados pelo desenvolvimento de longas extensões celulares que envolvem a bactéria aderida (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004). Bernet-Camard et al., (1996) postularam que as injúrias às microvilosidades provocadas pela *E. coli* DAEC podem ser resultado da desorganização da rede do citoesqueleto celular. Nos Quadros 2 e 3 são sumarizados os principais sorotipos de *E. coli* patogênicas, suas características de adesão e invasão, toxinas e sintomas das doenças, bem como as características, veículos e/ou fontes de surtos dos principais grupos de *E. coli* diarreioigênicas.

Quadro 2. Linhagens patogênicas de *E. coli*

Grupo	Sorogrupos	Características de adesão e invasão	Toxinas	Sintomas da doença
(ETEC)	O6, O8, O15, O20, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128, O139, O148, O153, O159, O167	Aderem uniformemente, mas não invadem	Termolábeis (LT) Termoestáveis (ST) A LT é similar à toxina colérica e age nas células da mucosa	Diarréia do tipo colérica, mas geralmente menos grave
(EPEC)	O18, O44, O55, O86, O111, O112, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142	Aderem em grupos; Invadem células hospedeiras, ligam e desaparecem	Não aparentes. Induz uma lesão característica (A/E) nas células epiteliais.	Diarréia, vômitos
(EIEC)	O124, O143, O152	Invadem células do cólon. Propagam-se lateralmente às células adjacentes	Nenhuma toxina semelhante à shiga toxina foi detectada	Propagação célula-célula e doenças similares à disenteria. Febre e diarréias profusas contendo muco e sangue.
(EHEC)	O26, O46, O48, O91, O98, O112, O146, O157, O165	Aderem fortemente. Ligam e invadem	Verotoxinas do tipo shigatoxinas (VTEC ou STEC)	Diarréia com sangue. Colite hemorrágica. Pode progredir para síndrome urêmica hemolítica (HUS) e para púrpura trombocitopênica.
(EAggEC)	Sorogrupos ligados a surtos recentes: O62, O73, O134.	Aderem em grupos, mas não invadem	Toxinas semelhantes à toxina ST. Hemolisinas. Verotoxinas relatadas em algumas linhagens.	Diarréia. Algumas linhagens têm sido relacionadas à síndrome urêmica hemolítica (HUS)

Fonte: Forsythe, (2002).

Quadro 3. Características e veículos ou fontes de surtos dos principais grupos de *E. coli* diarreio gênicas.

Grupo	Veículo, fontes e fatores de surtos	Principais fatores de virulência: cromossomal/plasmidial	Efeitos biológicos dos fatores de virulência
(EPEC)	Água não tratada Alimentos	Habilidade (<i>Attaching and Effacing</i> - A/E) EPEC – Plasmídeo de aderência (EAF) Bundle Forming Pilus (BFP) <i>LifA/Efa</i>	Adesão, destruição de microvilosidades, secreção de íons Adesão Adesão
(ETEC)	Água não tratada Alimentos	Enterotoxina termolábil/termoestável (LT,ST) Enterotoxina termoestável (EAST) Fatores de colonização fímbria (CFs)	Secreção de íons Secreção de íons Colonização
(EIEC)	Água, alimentos Restaurantes- refeições	<u>Grupo <i>Vir/IcsA</i></u> IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, IpaH Enterotoxina Shiguella 1 (ShET1)	Membrana enrugada, movimento intracelular Invasão, possível inflamação Secreção de íons
(EHEC)	Carnes Hambúrgueres Salsichas fermentadas Brotos de rabanetes Alimentos não pasteurizados Água não clorada Saladas	<u>Toxina Shiga (<i>Stx</i>)</u> Habilidade (<i>Attaching and Effacing</i> - A/E) Enterohemolisina (Ehly) <i>E. coli</i> secretora de proteínas (EspP) Toxina B <u><i>LifA/ Efa – 1</i></u>	Síntese de proteína inibitória do rRNA, apoptoses Adesão, destruição de microvilosidades, secreção de íons Lise de eritrócitos Serina protease Adesão Adesão
(EAEC)	Água, alimentos Restaurantes- refeições	Enterotoxina termoestável (EAST) Fímbria de Aderência Agregativa (AAF) Enterotoxina plasmidial (PET)	Secreção de íons Adesão Serina protease, secreção de íons, citotoxicidade
(DAEC)	Ambiental, estação chuvosa	<u>Adesina fímbria F1845</u> Adesina de aderência difusa (AIDA-1)	Adesão Adesão

Fonte: Karch et al., (1999); Kuhnert, Boerlin, Frey, (2000); Sharma, Sachdeva, Viridi, (2003); Kaper, Nataro, Mobley, (2004); Torres, Zhou, Kaper, (2005); Varnado et al., (2005).

3.6. Hortaliças

As hortaliças são parte integrante da dieta da população mundial. No Brasil, o consumo é ainda pequeno ficando, em média, em torno de 50kg por habitante/ano. Todavia, em função de algumas espécies serem excelente fonte de vitaminas, sais minerais e substâncias antioxidantes, como a vitamina C, o β -caroteno e o licopeno, este último comprovadamente relacionado com a prevenção de diferentes tipos de câncer, o consumo destes alimentos tem crescido no país (MORETTI, 2003).

Segundo Mikishima (2000) no Brasil o consumo *per capita* de hortaliças varia de 25Kg a 30Kg/ano nas regiões Norte e Nordeste e de 45Kg a 50Kg/ano nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Estas médias são bastante inferiores àquelas observadas em outros países, principalmente na Europa, Ásia e América do Norte onde o consumo *per capita* atinge de 100Kg a 110Kg/ano.

De acordo com Melo (2009) em 2004, o valor de produção das hortaliças no Brasil foi estimado em R\$ 11.696 milhões, sendo que a área cultivada alcançou 776,8 mil hectares gerando uma produção total de 16.086 mil toneladas. Três quartos do volume de produção concentram-se nas regiões Sudeste e Sul enquanto que o Nordeste e o Centro-Oeste respondem pelos 25% restantes. Na região Norte, a produção de hortaliças é incipiente e os mercados consumidores são abastecidos por produtos oriundos, principalmente, do Nordeste e Sudeste. Estima-se que de 8 a 10 milhões de pessoas dependam do agronegócio de hortaliças. Em 2006, a produção foi de 17,24 milhões de toneladas cultivadas em 771 mil hectares (EMBRAPA-HORTALIÇAS, 2009).

A olericultura no Estado do Maranhão não dispõe de dados suficientes e atualizados acerca da produção e consumo de hortaliças. No entanto, segundo a COHORTIFRUT – Cooperativa de Hortifruticultores de São Luís, em 2007, o volume total ofertado de produtos hortifrutis foi de 80.597,91 mil toneladas, participando com 39,66% da produção no âmbito nacional. Ainda segundo a COHORTIFRUT, entre as hortaliças mais produzidas e consumidas em São Luís/MA estão: a melancia, tomate, abóbora e a alface com um valor de produção estimado de 3.921,21 toneladas/ano (HORTICULTURA, 2009).

A importância da olericultura no cenário agrícola brasileiro se traduz pela alta rentabilidade, distribuição de renda e geração de empregos. Dentre os produtos agrícolas nacionais, as hortaliças só perdem em valores de produção para a cana-de-açúcar, café, soja e milho (CAETANO et al., 2001).

Entre as hortaliças mais consumidas no Brasil está a alface (Figura 14), a qual pertence à família das *Chicoriaceae* e por apresentar vitaminas A, B₁, B₂ e C, sais minerais, principalmente, o cálcio e por possuir baixo valor calórico é um componente bastante presente nas saladas dos brasileiros (SANTANA et al., 2006).



Fonte: Informação Nutricional, (2009).

Figura 14. Alface (*Lactuca sativa*)

Segundo Caetano et al., (2001) o mercado consumidor tem a preferência dividida entre as alfaces de folhas crespas e as lisas. Outros tipos de alface têm mercado específico, como as alfaces do tipo americana, preferidas pelas cadeias de “fast food”. Entre os cultivares temos:

a) Repolhuda lisa ou repolhuda manteiga: os cultivares deste tipo têm folhas lisas e tenras formando cabeças compactas. São as cultivares da série Brasil, Áurea, Elisa, Carolina e Aurélia.

b) Repolhuda crespa: também conhecidas como alface americana, as cultivares têm folhas crespas, conjugadas, crocantes e a cabeça compacta. São elas: Great Lakes, Salinas, Lucy Brown e Lorca.

c) Alface de folhas lisas: de folhas lisas e tenras, não formam cabeças tipo repolhuda. Os cultivares deste tipo mais conhecidas são: Babá de Verão, Monaliza, Regina e Vitória.

d) Alface de folhas crespas: as folhas são soltas, crespas, não formando cabeça tipo repolhuda. Os principais cultivares do grupo são: Grand Rapids, Brisa, Verônica e Marisa.

e) Tipo Romana: as folhas são alongadas, duras, com nervuras protuberantes e formam cabeça fofa. Os cultivares mais comuns com essas características são a Gallega e Romana.

O agrião (*Nasturtium officinale* R. Br.) (Figura 15) outra hortaliça também bastante apreciada pelos brasileiros, é uma planta herbácea, pertencente à família *Brassicaceae*. Suas partes aéreas são utilizadas na alimentação, apresentando odor característico, sabor agradável levemente amargo e picante. Contêm sais minerais, tais como o manganês, ferro, iodo, potássio e cálcio e as vitaminas A, C e E. Esta espécie vegetal é popularmente utilizada no tratamento de infecções infantis do trato urinário e como expectorante no tratamento de bronquites (BLUMENTHAL et al., 2000; BUFFON et al., 2005; CRUZ et al., 2006). Também há indicações de uso do agrião no tratamento de icterícia e em doenças periodontais como as gengivites (LOGGIA, 1993).



Fonte: Henriette, (2009).

Figura 15. Agrião (*Nasturtium officinale* R. Br.)

O cultivo da alface, assim como do agrião, é geralmente praticado na forma orgânica, convencional e hidropônica os quais apresentam características diferenciadas na produção, podendo influenciar nas propriedades destas hortaliças. Na cultura convencional, os vegetais crescem no solo com aporte adequado de nutrientes e água. Para uma melhor produção, fertilizantes são freqüentemente utilizados. A produção orgânica adota práticas de rotação de cultura, aproveitamento

de resíduos orgânicos (esterco) e controle biológico, eliminando a utilização de fertilizantes químicos. Esta técnica de cultivo apresenta uma grande vantagem comparada ao sistema convencional devido ao seu impacto benéfico ao meio ambiente (GUADAGNIN et al., 2005). Porém, segundo Miyazawa, Khatounian, Odenath-Penha (2001), durante o cultivo orgânico, as hortaliças ficam em contato com o solo úmido, adubado com adubos orgânicos (esterco), muitas vezes favorecendo a contaminação. Além disso, a grande maioria dos produtores irriga as hortaliças com águas provenientes de rios e córregos adjacentes às hortas, bombeadas ou levadas por meio de canais de irrigação sem nenhum tratamento prévio, o que favorece a contaminação.

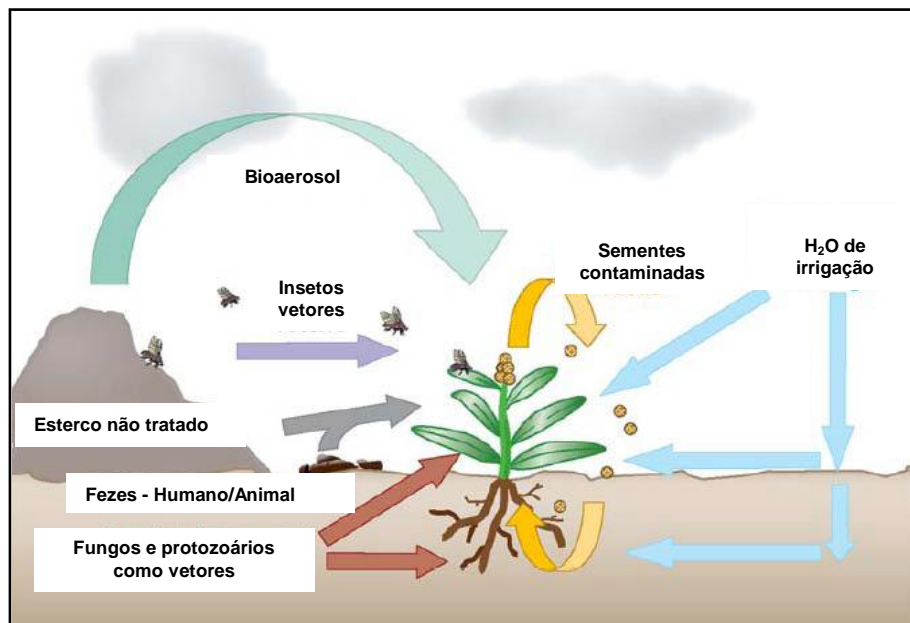
O sistema de cultivo hidropônico protege a hortaliça contra fatores adversos do meio ambiente, como chuvas, geadas e ventos fortes favorecendo o aumento da produtividade. Nesse sistema, as hortaliças recebem os nutrientes previamente dissolvidos em água e transportados por tubos plásticos, uma vez que são cultivadas fora de seu ambiente natural (solo) (SANTANA et al., 2006).

Usualmente consumidas cruas, as hortaliças têm no processo de higienização o único tratamento recebido entre o cultivo e o consumo. Se os processos de limpeza e sanitização forem realizados de forma inadequada, poderá propiciar a transmissão de diversas doenças. Em 1991, o surgimento da epidemia de cólera no Brasil despertou o interesse pelo assunto, tanto pelas autoridades sanitárias quanto pela população em geral (NASCIMENTO, 2002).

As hortaliças são consideradas um importante meio de transmissão de várias doenças infecciosas, as quais são favorecidas pela alta umidade presente desde o plantio até a comercialização do produto, pela microbiota microbiana proveniente do solo, água, ar, insetos e animais, pela estrutura da planta, pela tecnologia de cultivo, manipulação, transporte e armazenamento (BALIONI et al., 2003). Vários são os microrganismos contaminantes de hortaliças e potenciais causadores de doenças, entre os quais estão a *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., *Yersinia enterocolítica*, os coliformes além de protozoários e helmintos que possuem condições favoráveis para crescer em hortaliças conservadas em temperatura ambiente (SILVA, OLIVEIRA, STANFORD, 2003). As doenças transmitidas por alimentos são, predominantemente, resultantes do ciclo de contaminação fecal/oral (MESQUITA et al., 1999).

Dentro do grupo dos coliformes está a *Escherichia coli*, a qual é membro da microbiota intestinal e causadora de diarréias. O significado da presença de *E. coli* em um alimento deve ser avaliado sob dois aspectos: o primeiro se trata de uma enterobactéria e uma vez detectada no alimento indica que este possui uma contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, está em condições higiênicas inadequadas, o segundo é que algumas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem (TRABULSI, 2008).

A contaminação dos vegetais pode ocorrer durante o cultivo, na colheita e após a colheita. No cultivo são importantes: a contaminação do solo por material fecal, qualidade da água utilizada para irrigação e outros usos, uso de esterco animal fresco ou curado (compostagem) de forma inadequada, poeira e material em suspensão no ar, presença de insetos atuando como vetores de contaminações (Figura 16); após a colheita: a manipulação das hortaliças em condições higiênicas insatisfatórias, deficiência no processo de desinfecção (Figura 17-A), transporte e armazenamento, bem como, comercialização em supermercados e feiras livres sob condições favoráveis a proliferação de microrganismos (Figura 17-B e C) (LEITÃO, 2004). Sendo assim, as práticas higiênico-sanitárias, bem como a implantação das Boas Práticas de Fabricação e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC são necessárias em todas as etapas da cadeia alimentar (LEVINGER, 2005).



Fonte: Brandl, (2006).

Figura 16. Contaminação das hortaliças durante o cultivo



Fonte: O Autor, (2009).

Figura 17. Contaminação das hortaliças pós-colheita: (A) higienização; (B) comercialização – supermercados e (C) feiras livres.

Além da contaminação das hortaliças por bactérias patogênicas em decorrência do contato das mesmas com esterco durante a produção, outro fator preocupante diz respeito ao processo de internalização de patógenos durante o desenvolvimento dos vegetais, onde estes ficam protegidos contra a remoção pela lavagem ou contra a ação de sanitizantes (SOLOMON, YARON, MATTHEWS, 2002). A internalização de patógenos humanos tem sido observada em vários vegetais (ITOH et al., 1998; WACHTEL, WHITELAND, MANDRELL, 2002; JABLASONE, WARRINER, GRIFFITHS, 2005). Solomon, Yaron, Matthews (2002) demonstraram a internalização da *E. coli* O157:H7 nas partes comestíveis da alface oriundas de mudas cultivadas a partir de sementes cultivadas em solo adubado com esterco contaminado utilizando o plaqueamento seletivo e posterior escaneamento a

laser e microscopia de epifluorescência. No entanto, nenhuma informação quantitativa foi dada no que diz respeito ao grau de contaminação.

Estudos têm demonstrado o potencial para a associação de alimentos com agentes patogênicos e as estruturas internas de tecidos vegetais. Pontos de entrada dos microrganismos em plantas incluem tecidos danificados, tecido cicatricial do caule, estômatos e as áreas de surgimento de raízes laterais. A entrada da bactéria pode ocorrer tanto na pré quanto na pós-colheita (STURZ, CHRISTIE, NORWALK, 2000).

Pesquisas recentes têm evidenciado que bactérias patogênicas, bem como vírus e certos parasitas, apresentam doses infectantes (ou seja, o número de células que devem ser ingeridas para provocar a doença) extremamente reduzidas, por vezes inferiores a 100 células, razão pela qual, a ingestão de vegetais contaminados pode ocasionar sérias toxinfecções alimentares (LEITÃO, 2004). A preocupação relativa à contaminação biológica dos vegetais não reside apenas nos riscos de contaminação e multiplicação dos patógenos, mas também na sua capacidade de sobrevivência em ambientes, às vezes aparentemente desfavoráveis, representado pela superfície ou interior dos vegetais (NACMCF, 1999). A segurança alimentar é o atributo de qualidade mais desejável, assim, os produtos hortícolas devem ser isentos de toda e qualquer substância química e agentes biológicos que possam ocasionar prejuízos à saúde dos consumidores (CHITARRA, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coletas das amostras

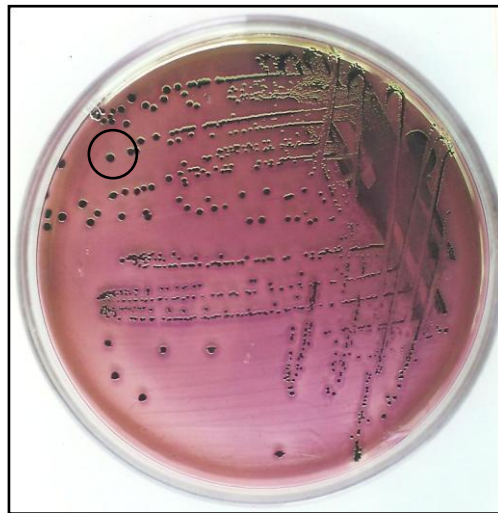
Nesta pesquisa, foram analisadas duas hortaliças folhosas consumidas *in natura*, a alface (*Lactuca sativa*) da variedade crespa, considerada a mais comum e possivelmente a mais consumida em relação às outras variedades de alface e o agrião (*Nasturtium officinale* R. Br.) cultivadas pelos sistemas orgânico e hidropônico. Foram coletadas 100 amostras de alfaces, sendo 50 de alfaces orgânicas e 50 hidropônicas e 60 de agrião, a saber, 30 orgânicos e 30 hidropônicos. As amostras de hortaliças orgânicas foram adquiridas em três feiras livres e as hidropônicas em dois supermercados da cidade de São Luís/MA. A escolha das hortaliças analisadas nessa pesquisa foi em decorrência das mesmas estarem entre as mais consumidas pela população maranhense. Já a opção pelos sistemas de cultivo baseou-se no fato de fornecerem alimentos mais saudáveis, ou seja, livres de agrotóxicos e/ou pesticidas. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno e transportadas em caixas isotérmicas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Maranhão para a realização das análises pertinentes.

4.2 Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

Para o isolamento e identificação de *Escherichia coli* nas amostras de hortaliças, inicialmente, 25g de cada amostra foram homogeneizadas em 225mL de Caldo Infusão de Cérebro e Coração (Caldo BHI) e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por três horas. Este caldo proporciona a recuperação das condições fisiológicas do microrganismo e estimula a produção enzimática aumentando o potencial patogênico. Após o período de incubação, todo o inóculo foi transferido para 250mL de Caldo *Escherichia coli* (Caldo E.C) e incubado a 37°C por

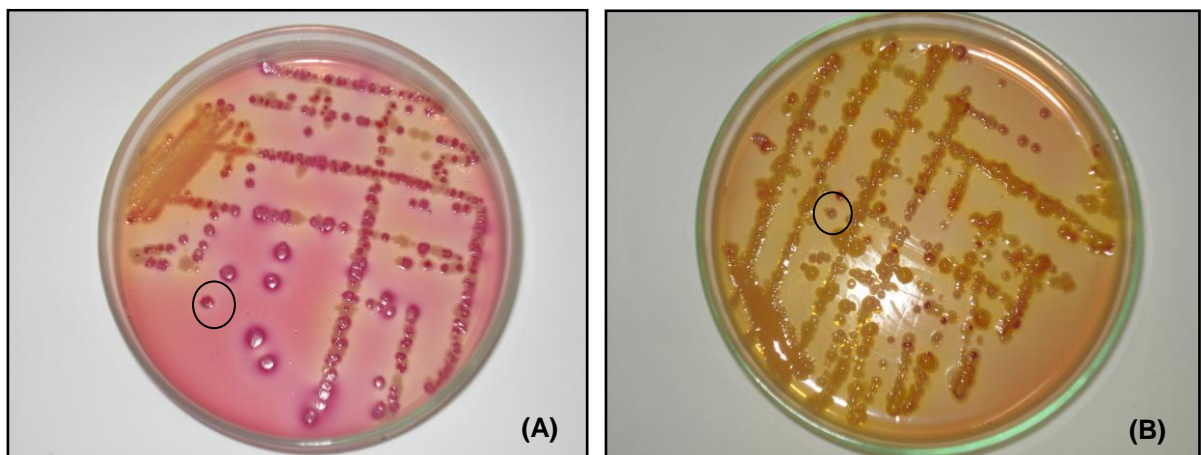
24 horas. O isolamento foi realizado em meios seletivos e diferenciais, Agar Eosina Azul de Metileno (Agar EMB) e Agar MacConkey Sorbitol (Agar MCS) (Apêndice A).

Para a identificação da espécie de *Escherichia*, inicialmente foram selecionadas cinco colônias típicas nos meios de cultura seletivos, ou seja, as colônias pequenas com brilho verde metálico ou negra sem brilho no Agar EMB (Figura 18) e as de coloração rosa intenso (sorbitol positiva) (Figura 19A) e amareladas (sorbitol negativa) (Figura 19B) no Agar MCS. Em seguida, as colônias foram isoladas em tubos contendo Agar Triptona de Soja (Agar TSA) inclinado com posterior incubação a 37°C por 24 horas, de acordo com a metodologia proposta por Kornacki e Johnson (2001).



Fonte: O Autor, (2009).

Figura 18. Características do crescimento de *Escherichia coli* em Agar Eosina Azul de Metileno



Fonte: O Autor, (2009).

Figura 19. Características de colônias características de *Escherichia coli* no Agar MacConkey Sorbitol. (A): sorbitol positiva e (B) sorbitol negativa.

A identificação bioquímica foi realizada utilizando-se os testes convencionais, a saber: indol, citrato de simmons, vermelho de metila (VM), Vogues-Proskauer (VP), malonato, fermentação de carboidratos – sorbitol, ramnose, manitol, arabinose, inositol e rafinose, descarboxilação de aminoácidos - lisina e ornitina, motilidade e produção de H₂S em Agar SIM (APHA, 2001) e pelo sistema API 20E (bioMérieux) composto pelos testes bioquímicos: ONPG (presença ou ausência da enzima β-galactosidase utilizando o composto o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo), descarboxilação de aminoácidos – arginina, lisina e ornitina, citrato de simmons, produção de H₂S, uréia, TDA (Tryptona desaminase), indol, Vogues-Proskauer, gelatina e fermentação dos carboidratos – glicose, manose, inositol, sorbitol, rafinose, sacarose, melbiose, amilose e arabinose (BIOMÉRIUX, 1997).

4.3 Testes sorológicos

Para a identificação sorológica das *E. coli* enteropatogênicas foram utilizados soros polivalentes contendo anticorpos contra antígenos O e monovalentes (Probac do Brasil). Os soros polivalentes utilizados para a identificação dos sorogrupos de *E. coli* EPEC clássica foram: soro polivalente A, contendo anticorpos contra os sorogrupos O26, O55, O111 e O119, Poli B para o O114, O125, O142 e O158 e Poli C para o O86, O126, O127 e O128. Os soros monovalentes possuindo anticorpos contra cada um dos sorogrupos anteriormente citados, separadamente, foram testados de acordo com a classificação obtida após a aplicação dos soros polivalentes. Para a identificação dos sorogrupos pertencentes à categoria das *E. coli* EIEC, usou-se soros polivalentes A contendo anticorpos para os sorogrupos O29, O136, O144 e O152 e Poli B para o O124, O143, O164 e O167. Os monovalentes foram testados em seguida à primeira identificação (soros polivalentes). No que se refere à identificação do sorogrupo O157 (*E. coli* EHEC) aplicou-se o soro anti *E. coli* O157. A escolha das categorias de *E. coli* EPEC, EHEC e EIEC foi em decorrência das mesmas estarem frequentemente associadas a surtos de toxinfecções alimentares.

Para a realização dos testes sorológicos, inicialmente foram feitas culturas de 24 horas em Agar TSA. Em seguida, a cada uma das culturas adicionou-se 1mL

de água estéril para a obtenção de uma suspensão. A partir das suspensões, retirou-se assepticamente, alíquotas de 0,1mL e adicionou-se à superfície de uma lâmina de vidro limpa, seca e higienizada com álcool 70%. As *E. coli* foram testadas, primeiramente para os soros polivalentes A, B e C para a *E. coli* EPEC clássica, A e B para a *E. coli* EIEC e para o anti-soro *E. coli* O157. Posteriormente, foram testados os soros monovalentes de acordo com a classificação obtida nos soros polivalentes. A prova sorológica positiva consistiu da aglutinação do soro após a sua adição a suspensão da cultura bacteriana em estudo. O controle negativo do soro foi realizado adicionando-se gotas do mesmo a uma gota de solução salina verificando-se a não ocorrência de autoaglutinação (Apêndice B) (APHA, 2001).

4.4 Extração e análise dos óleos essenciais

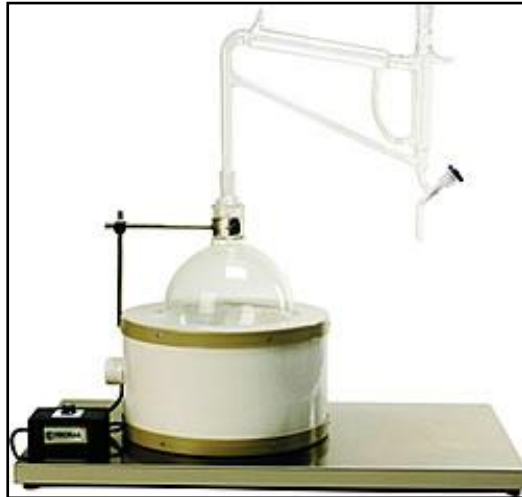
4.4.1 Amostra vegetal

O manjeriço foi coletado em hortas de plantas medicinais comunitárias localizadas nos arredores da cidade de São Luís/MA e as amostras do gengibre foram obtidas em supermercados da rede varejista. Inicialmente, amostras das plantas a serem utilizadas na pesquisa foram encaminhadas ao Herbário – Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para a identificação botânica. Essa identificação foi realizada pela professora especialista Ana Zélia Silva e as exsiccatas catalogadas sob o registro Nº 1376 para o manjeriço e o Nº 1678 para o gengibre, respectivamente.

4.4.2 Extração dos óleos essenciais do manjeriço (*Ocimum basilicum* Linn.) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)

As extrações dos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Programa de Controle de Qualidade

de Alimentos e Água (PCQA) da Universidade Federal do Maranhão. Para essas extrações, utilizou-se o processo de hidrodestilação usando-se o sistema de Clevenger, segundo metodologia descrita por Matos (1988) por ser considerado o de maior rendimento (Figura 20).



Fonte: O Autor

Figura 20. Sistema Clevenger – Extrator de óleos essenciais

Para a extração do óleo essencial do manjeriço utilizou-se as folhas da planta, as quais inicialmente foram secas a temperatura ambiente e em seguida moída. O processo de secagem teve como finalidade melhorar o rendimento do óleo essencial da planta, pois, segundo Martins (2000), é possível que o menor conteúdo de água nas folhas, após a secagem permita que a corrente de vapor gerada no extrator possa arrastar com mais eficiência as substâncias voláteis armazenadas nas células, quando comparado com material verde.

Para a destilação do óleo do manjeriço, cerca de 300g do material (pó) foi adicionado em um balão de fundo chato (6000 mL) e acrescentou-se água destilada na proporção de 1:10. Após a extração, o óleo foi seco (retirada da água remanescente da destilação) utilizando-se sulfato de sódio anidro. O óleo essencial do gengibre foi extraído a partir dos rizomas frescos. Os rizomas, após serem triturados com água destilada na proporção de 1:10, foram adicionados a um balão de fundo chato (6000 mL), o qual foi acoplado ao sistema de Clevenger. Após a extração, o óleo foi seco utilizando-se sulfato de sódio anidro. O tempo utilizado para a extração dos óleos essenciais foi de quatro horas, segundo metodologia recomendada pela AOAC (1980) e Santos et al., (2004).

O rendimento do óleo essencial foi expresso em % na relação massa/massa pela medida da densidade, observando o volume (mL) de óleo essencial obtido após a extração do óleo por massa (g) de material vegetal, conforme a fórmula descrita abaixo (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 1996; FABROWSKI, 2002).

$$\%R = \left(\frac{V(\text{mL}) \times d}{m(\text{g})} \right) \times 100$$

Onde:

V = volume de óleo após processo de extração;

d = densidade do óleo;

m = massa em gramas da planta

4.4.3 Análise Cromatográfica (CG/EM)

Para a identificação dos constituintes dos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre, utilizou-se a técnica de Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM). As condições de análise dos óleos essenciais estão descritas abaixo:

- ❖ Equipamento: CG/EM, modelo QP – 5000, fabricado pela Shimadzu;
- ❖ Método: OE_1.met;
- ❖ Amostras: inicialmente pesou-se 1,0mg de cada amostra e dissolveu-se em 1000 μ L de diclorometano (pureza 99,9%);
- ❖ Volume injetado: 0,3 μ L;
- ❖ Coluna: Capilar, 30m x 0,25mm x 0,25 μ m. HP-5MS, 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano (Equivalente DB-%MS ou CP-Sil 8CB LB\MS);
- ❖ Gás de arraste: He (99,9995%); fluxo: 1,0 mL/min.;
- ❖ Injetor: 280°C, modo Split (1:10);

❖ Forno: 40°C (5,0min) → 240°C (4°C\min.); 240°C → 300°C (8°C\min, 7,5 min); $t_T = 60,0$ min.;

❖ Detector: EM¹; EI (70 eV);

Modo de varredura (0,5 seg.\sacn).

Faixa de massas: 40-500 daltons (uma).

Linha transferência: 280°C

Filamento: desligado 0,0 a 4,0 min.

Obs: ¹Espectrômetro de massas tipo quadrupolo linear.

Para a identificação dos compostos detectados nas amostras utilizou-se as bases de dados de espectros de massas NIST105, NIST21 e WILEY139. O programa AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution Mass and Identification System) foi utilizado para a interpretação dos espectros de massas quando havia diferenças significativas entre o espectro de massas obtido e o encontrado na biblioteca do CG/EM.

4.4.5 Caracterização físico-química dos óleos essenciais

Na caracterização das propriedades físico-químicas dos óleos essenciais, determinou-se o índice de refração, a densidade relativa, a solubilidade em etanol a 90%, cor e aparência (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1996).

4.4.5.1 Determinação da densidade relativa ²⁰d₂₀

As densidades relativas dos óleos essenciais de manjeriço e de gengibre foram determinadas pelo método do picnômetro, por comparação das massas de igual volume da amostra e da água recém destilada a 25°C.

Após a determinação da massa de um tubo capilar limpo e seco, este foi preenchido com água destilada e sua massa foi novamente aferida. O valor da

massa de água foi obtido pela diferença entre a massa do capilar contendo água destilada e a massa do capilar vazio.

O tubo capilar foi então esvaziado e seco com o auxílio de solventes voláteis. A amostra foi colocada no tubo capilar e a massa foi medida. A massa da amostra correspondeu à diferença da massa do capilar contendo o óleo essencial e da massa do capilar vazio. O quociente entre a massa da amostra do óleo e a massa da água, a 20°C, forneceu o valor da densidade relativa (${}_{20}d^{20}$).

4.4.5.2 Determinação do índice de refração ${}^{20}_n d$

Os índices de refração dos óleos essenciais foram obtidos em refratômetro de Abbé, em função da luz de sódio no comprimento de onda de 589,3nm e a temperatura de 25°C. A calibração do aparelho foi feita com água destilada, cujo índice de refração foi de 1,3325 a 25°C.

4.4.5.3 Determinação da solubilidade do óleo essencial em álcool 90%

Para a determinação de solubilidade dos óleos essenciais em álcool utilizou-se uma mistura de etanol/água a 90% (v/v). O teste foi realizado mantendo-se constante o volume de óleo (1mL) e adicionando-se volumes crescentes da solução alcoólica até solubilização total do óleo.

4.4.5.4 Cor

A técnica proposta é a visual, feita por comparação das cores das essências com as cores conhecidas.

4.4.5.5 Aparência

A técnica proposta também é a visual, onde se faz uma comparação das essências no que diz respeito a sua transparência ou limpidez.

4.5 Antibiograma

Para a avaliação das atividades antibacterianas dos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre, utilizou-se o Método de Difusão em Disco (MDD) (BAUER et al., 1966; CLSI, 2009). Para este teste, as *E. coli*, após identificação sorológica, foram cultivadas em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (Caldo BHI) com incubação a 35°C/24 horas. Após o período de incubação, foram realizadas diluições sucessivas e comparadas até uma turbidez de 0,5 na escala de MacFarland (10^8 células/mL). De cada cultura, retirou-se uma alíquota de 0,1mL, a qual foi inoculada na superfície do Agar Müeller Hinton e espalhado com auxílio de uma zarogatoa. Os discos de papel previamente impregnados com 75µL dos óleos essenciais foram então colocados no centro da placa com o auxílio de uma pinça previamente flambada. Os discos foram pressionados levemente contra a superfície do meio e em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. A leitura dos halos de inibição foi feita com o auxílio de uma régua milimetrada (Apêndice C).

Para a determinação da atividade inibitória dos óleos essenciais testados frente as *E. coli* EPEC isoladas das hortaliças em questão, utilizou-se como parâmetro os padrões de sensibilidade adotados por Moreira et al., (2005) os quais classificaram a atividade de diferentes óleos essenciais de acordo com o tamanho do halo de inibição, a saber: não sensível (-) para diâmetros ≤ 8 mm; sensível (+) para diâmetros de 9-14mm; muito sensível (++) para 15-19mm e extremamente sensível (+++) para os halos com diâmetros ≥ 20 mm.

4.6 Análise Estatística

Os experimentos constaram da análise da atividade antibacteriana para os óleos essenciais de manjeriço e de gengibre por meio das médias dos diâmetros dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em disco. Para a avaliação do efeito inibitório dos óleos essenciais sobre o crescimento das bactérias, os dados experimentais foram submetidos ao teste paramétrico para a diferença entre duas médias populacionais (amostras pequenas e independentes) e com um nível de significância de 5%, utilizou-se o software STATISTICA 7.0. Este teste foi realizado supondo-se que as variâncias populacionais σ_1^2 e σ_2^2 são desconhecidas e estimadas em pequenas amostras ($n \leq 30$); com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade. Neste caso o critério de decisão para testar a hipótese nula: $\mu_1 - \mu_2 = d_0$, foi baseado no teste “t-Student” e considerando que, as populações são aproximadamente normais (STATSOFT, 1996).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação de *Escherichia coli* H₂S positiva isoladas das amostras de alface e do agrião

A produção de H₂S a partir de fontes orgânicas ou inorgânicas de enxofre não é uma característica típica da espécie *Escherichia coli* (BELL, KYRIAKIDES, 1998). No entanto, as *E. coli* EPEC isoladas das amostras de alfaces e dos agriões orgânicos comercializados em feiras livres na cidade de São Luís/MA foram positivas para esta habilidade, tanto em Agar SIM quanto no sistema de identificação rápida API 20E (bioMerieux) (Figuras 21 e 22). Sendo assim, as *E. coli* isoladas dessas hortaliças podem ser consideradas mutantes por apresentarem uma característica atípica à essa espécie. Entre os sorogrupos de *E. coli* EPEC H₂S positivas estão: O26, O55, O111, O114, O125, O126, O127 e O142 para as amostras de alface e O55 e O126 para o agrião.



Fonte: O Autor, (2009).

Figura 21. Identificação bioquímica da *E. coli* em sistema API 20E. (A): *E. coli* enteropatogênica H₂S (+) e (B): *E. coli* típica H₂S (-).



Fonte: O Autor, (2009).

Figura 22. Produção de H₂S por *E. coli* enteropatogênica em Agar SIM

Treleaven, Diallo e Renshaw (1980) relataram que, ocasionalmente, organismos que não possuíam a capacidade de produzir H₂S podem aparecer com essa habilidade espontaneamente. De acordo com esses autores, esse fenômeno pode ser associado à aquisição de plasmídeos por meio de transferência genética extracromossomal a partir de outros gêneros de bactérias. O primeiro estudo amplo sobre *E. coli* H₂S positiva foi realizado por Lautrop, Orakov e Gaarslev (1971) na Dinamarca.

Segundo Harnett et al., (1996) a produção de H₂S pela *E. coli* pode está relacionada a aquisição de um plasmídeo de 35 Megadaltons (Md) denominado de pNH223, o qual carrega o(s) gene(s) para a produção de H₂S a partir de outras bactérias portadoras naturais dessa habilidade como é o caso da *Salmonella* sp. que também pertence a família *Enterobacteriaceae*. Alguns estudiosos relataram que uma análise comparativa das seqüências de RNA ribossomal 5S e 16S, sugere que a *Escherichia coli* e a *Salmonella* derivam de um ancestral comum entre 120 e 160 milhões de anos atrás (ELENA et al., 2005).

Sendo assim, em virtude das *Escherichia coli* isoladas das amostras de alface e agrião terem apresentado uma característica atípica a essa espécie, faz-se necessário, então, o desenvolvimento de novas pesquisas com a finalidade de aperfeiçoar as técnicas de isolamento e identificação dessa bactéria. De acordo com os resultados obtidos nessa pesquisa, muitos diagnósticos falsos positivos podem estar ocorrendo, pelo fato da bactéria em questão corresponder as características

morfocoloniais no meio de plaqueamento seletivo e na realidade ser outro microrganismo lactose positivo que é o substrato de eleição para os coliformes, uma vez que os meios não são 100% seletivos. Por outro prisma, muitos diagnósticos falsos negativos podem estar ocorrendo, pois em provas bioquímicas muitas *Escherichia coli* H₂S positivas estão sendo dispensadas.

5.2 Freqüência e percentual de isolamento de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de alfaces e agriões cultivados pelos sistemas orgânico e hidropônico

Os dados referentes à freqüência e percentual de isolamento de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas das amostras de alface e agrião cultivados pelos sistemas orgânico e hidropônico comercializados em feiras livres e supermercados, respectivamente, na cidade de São Luís/MA estão expressos na Tabela 1.

Os resultados evidenciaram que do total de 420 colônias características de *E. coli* isoladas das amostras de alface (230 do sistema orgânico e 190 hidropônico), após os teste bioquímicos, 150 foram identificadas como *E. coli* (75 do sistema orgânico e 75 hidropônico), dessas, 61 (45,5%) isoladas das amostras de alfaces orgânicas e 16 (12%) das hidropônicas foram positivas para sorogrupos de *E. coli* EPEC clássica. Entre as *E. coli* EPEC isoladas das alfaces orgânicas, 54 foram positivas para os sorogrupos: O55; O26; O111; O114; O125; O126; O127 e O142 e 7 foram positivas para o sorogrupo O157 (*E. coli* EHEC). No entanto, no que se refere às alfaces hidropônicas, identificou-se *E. coli* EPEC pertencentes aos sorogrupos: O55; O111, O114; O125; O127 e O142. De acordo com os resultados, as alfaces provenientes das feiras livres (alfaces orgânicas) apresentaram os maiores níveis de contaminação em relação às coletadas nos supermercados (alfaces hidropônicas), porém, o que se observou é que, tanto as amostras coletadas nas feiras livres quanto as dos supermercados mostraram semelhanças entre os sorogrupos de *E. coli* EPEC clássica identificados. Não foi constatada a presença do sorogrupo O157 nas amostras de alfaces hidropônicas analisadas.

Tabela 1. Frequência e percentual de isolamento de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas das amostras de alfaces e agrião cultivadas pelos sistemas orgânico e hidropônico comercializadas em feiras livres e supermercados da cidade de São Luís/ MA.

Amostras	Sistema de Cultivo	N ₁	N ₂	N ₃	Sorogrupos de <i>Escherichia coli</i>								
					EPEC								EHEC
					O55	O26	O111	O114	O125	O126	O127	O142	O157
					n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
Alface	Orgânico	50	75	61	29 (47,54%)	3 (4,92%)	1 (1,64%)	2 (3,28%)	9 (14,75%)	2 (3,28%)	1 (1,64%)	7 (11,47%)	7 (11,47%)
	Hidropônico	50	75	16	6 (37,5%)	-	3 (18,75%)	2 (12,5%)	2 (12,5%)	-	1 (6,25%)	2 (12,5%)	-
Agrião	Orgânico	30	75	16	2 (12,5%)	-	-	-	4 (25%)	8 (50%)	2 (12,5%)	-	-
	Hidropônico	30	75	35	4 (11,43%)	-	-	-	1 (2,86%)	29 (82,85%)	1 (2,86%)	-	-
Total		160	300	128	41	3	4	4	16	39	5	9	7

Nota: N₁: número de amostras analisadas; N₂: número de *E. coli* identificadas bioquimicamente; N₃: número de *E. coli* positivas no teste sorológico; n: número de *E. coli* positivas para os sorogrupos testados; (%): percentual de isolamento dos sorogrupos; (-): Não identificado.

Após a realização das análises nas amostras de agrião coletadas em feiras livres (agrião orgânico) e supermercados (hidropônico) isolou-se um total de 360 colônias características de *E. coli* (214 do agrião orgânico e 146 do hidropônico) as quais, foram submetidas à identificação bioquímica. Do total de bactérias testadas, 150 foram confirmadas como *E. coli* (75 de cada sistema de cultivo) sendo então aplicados os testes sorológicos. Após os testes sorológicos, 51 (34%) foram positivas para *E. coli* EPEC clássica (16 do agrião orgânico e 35 do hidropônico), sendo identificados no agrião de ambos os sistemas de cultivo, os sorogrupos: O55, O125, O126 e O127. O sorogrupo O126 apresentou maior percentual de isolamento (82,85%) nas amostras de agrião hidropônico (Tabela 1). Não foi constatada a ocorrência de contaminação por sorogrupos pertencentes à categoria de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) em nenhuma das hortaliças analisadas (alface e agrião).

Safariková e Safarik (2001) em estudo que avaliou o isolamento e detecção de *E. coli* O26, O111 e O157 em amostras de vegetais por separação imunomagnética, incluindo a alface, constataram que 93% das amostras apresentaram contaminação por estes sorogrupos. Palú et al. (2002) avaliando frutas e hortaliças servidas em restaurantes self-service privados da Universidade Federal do Rio de Janeiro detectaram a presença de *E. coli* EPEC em 46% das amostras de alfaces analisadas, sendo identificados os sorogrupos O26, O55, O111, O119, O125, O127 e O142.

Os sorogrupos de *Escherichia coli* O111 (EPEC) e O157 (EHEC) estão comumente associados a surtos de gastroenterites e a síndrome hemolítica urêmica. No entanto, o sorogrupo O26, pertencente também à categoria das linhagens patogênicas (EPEC), tem emergido como um potencial causador de gastroenterite infantil e de síndrome urêmica hemolítica em virtude de ser produtora de Shiga toxina e de apresentar a capacidade de formar as lesões A/E (ZHANG et al., 2000). Sorogrupo este isolado das amostras de alfaces provenientes das feiras livres.

Frutas e vegetais contaminados com *E. coli* O157:H7 tem contribuído para o aumento no número de surtos. Produtos hortícolas, tais como frutas, brotos e alfaces frescas têm sido implicados em surtos de origem alimentar causados por esse sorotipo (HILBORN et al., 1999). Os vegetais folhosos foram citados como um dos principais veículos de transmissão de doenças nos Estados Unidos entre 1998-99. A contaminação de hortaliças pode ocorrer de várias formas, no entanto, a utilização do esterco e a água contaminada com fezes são as principais rotas. Nos

casos citados acima, o esterco de gado nas proximidades dos lotes foi suspeito de ser a fonte original de *E. coli* O157:H7 (SOLOMON, POTENSKI, MATTHEWS, 2002).

A prática de usar o esterco como adubo orgânico para o cultivo de hortaliças tem preocupado as autoridades de Saúde Pública, visto que este material é fonte potencial de contaminação dos vegetais com diferentes patógenos tais como, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* sp., as quais estão presentes no trato gastrointestinal de animais e conseqüentemente no esterco usado como fertilizante (LONCAREVIC et al., 2005). Embora as condições externas ao animal hospedeiro sejam desfavoráveis para o seu crescimento, esses patógenos podem sobreviver por longos períodos no esterco ou no solo adubado com esterco (HIMATHONGKHAM et al., 1999).

Em uma pesquisa sobre a presença de linhagens patogênicas de *Escherichia coli* em esterco bovino, incluindo a *E. coli* O157:H7, verificou-se que este patógeno pode sobreviver no esterco por 42-49 dias a 37°C e por 49-56 dias a 22°C (WANG, ZHAO, DOYLE, 1996). Outro estudo sobre o comportamento da *E. coli* O157:H7 em esterco mostrou que esta bactéria pode sobreviver até 47 dias, 4 meses e 21 meses em esterco bovino, esterco de ovinos aerados e de ovinos não aerados, respectivamente (KUDVA, BLANCH, 1998). Beuchat (1999) conseguiu detectar *E. coli* O157:H7 em alfaces contaminadas por esterco armazenada a 15 dias a 4°C, mesmo o inóculo inicial sendo de apenas 10^0 - 10^1 UFC/g.

De acordo com McMahon e Wilson (2001) o adubo orgânico deve ser compostado em temperatura bastante alta durante pelo menos três meses, tempo necessário para eliminar a maioria dos patógenos. Porém Droffner e Brinton (1995) relataram que algumas bactérias podem sobreviver até 59 dias em condições de compostagem. Para Kouba (2003) mesmo que a compostagem seja efetiva para a destruição do patógeno, não destruirá, por exemplo, as formas esporuladas de *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*.

Embora a eliminação dos patógenos pelo sistema de compostagem seja bem documentada (DEPORTES et al., 1998; TIQUIA et al., 2002; LARNEY et al., 2003), as condições de compostagem (tempo, temperatura) necessárias para conseguir a eliminação ou redução do número de células de *E. coli* varia extensamente. Em uma pesquisa realizada por Turner (2002) foi verificada a inativação de células de *E. coli* em esterco de porcos misturadas com palha após 2

horas na temperatura de 50°C. No entanto, Lau e Ingham (2001) relataram que a *E. coli* pode ser recuperada do esterco bovino após 19 semanas a 21°C. Neste trabalho, células de *E. coli* puderam ser recuperadas em cada condição de teste por até 120 dias, mas as linhagens de STEC não-O157 apresentando o gene Stx2 não foram encontradas após o trigésimo dia, assim, a competição entre as bactérias parece ser um ponto muito importante juntamente com a temperatura. Aparentemente, as linhagens de STEC são mais sensíveis às altas temperaturas do que a *E. coli* comensal.

Ingham et al., (2004) analisaram a contaminação de cenouras e alfaces de lavouras de áreas fertilizadas com esterco não-composto e determinaram a presença de células de *E. coli* até 168 dias após a aplicação. Avery, Moore e Hutchison (2004) adubaram áreas com fezes de gado bovino, ovelha e porco contaminadas por *E. coli* O157 e conseguiram recuperar este patógeno em até 162 dias após a aplicação inicial, observaram ainda que a taxa de declínio foi maior e mais rápido nas fezes de porco contaminadas do que nas de boi e ovelha.

Várias pesquisas têm sido realizadas para determinar a presença de patógenos em varias formas de resíduos de animais e água de irrigação destinada para a aplicação em áreas de cultivo. Vernozy-Rozand et al., (2002) realizaram uma pesquisa para a determinação da presença de *Escherichia coli* produtora de Vero toxinas (VTEC) em esterco composto, lamas e em saídas de estação de tratamento de esgoto na França. Um total de 24% das amostras continha linhagens de *E. coli* que foram PCR positiva para o gene Stx2, 33% para o Stx1 e 19% para o gene *eae*. Pelo menos uma *E. coli* dos sorogrupos O157, O26 e O55, potencialmente patogênicas para humanos, foram detectadas. Os autores enfatizam ainda a necessidade de se aprimorar a manipulação e o uso do esterco, chorume e da lama de depuração como adubo orgânico, para que o risco de contaminação de frutas e hortaliças por *E. coli* produtoras de toxinas possa ser minimizado.

Outra fonte comum de contaminação de hortaliças é a água de irrigação que pode apresentar uma grande quantidade de contaminantes como coliformes de origem fecal, salmonelas, ovos de helmintos, cistos de protozoários e outros, quando associada a descargas de esgotos ou até mesmo a presença de animais próximos a essas áreas (PACHECO et al., 2002). De acordo com Oliveira e Germano (1992) a água utilizada na irrigação é proveniente de rios, córregos, lagos ou poços adjacentes às hortas, sendo raramente usada a água de abastecimento público,

devido principalmente ao seu alto custo, uma vez que, a demanda exigida para este propósito é bastante elevada.

Frequentemente se observa a disposição inadequada de esgotos domésticos bem como deficiências de saneamento básico em alguns locais contribuindo efetivamente para a contaminação dos recursos hídricos, inclusive dos lençóis freáticos por material fecal. No Nordeste do Brasil, por exemplo, a escassez de recursos hídricos tem levado ao emprego indiscriminado de águas de córregos, barreiros, açudes e rios contaminados na produção de hortaliças (DINIZ, 1994; CEBALLOS, KONIG, OLIVEIRA, 1998).

Guimarães et al. (2003) observaram um alto grau de contaminação por coliformes de origem fecal em verduras transmitidos pela água de irrigação. Em Lavras/MG, as análises microbiológicas realizadas em mananciais revelaram que quase a totalidade dos locais investigados apresentava contaminação por coliformes fecais (ROCHA et al., 2002). Esse fato pode justificar a contaminação por *Escherichia coli* encontrada nas amostras de hortaliças avaliadas nesta pesquisa. No entanto, a contaminação dessas hortaliças poderá ter ocorrido em algum momento durante a produção, o transporte, armazenamento ou manipulação inadequada.

Outra importante fonte de contaminação dos alimentos no campo é o trabalhador agrícola, o qual pode exercer um impacto importante na segurança sanitária dos produtos que ele cultiva. O grau de higiene pessoal do agricultor pode exercer uma forte influência na transmissão de bactérias patógenas, visto que essas pessoas têm contato direto com o alimento durante toda a etapa de produção e principalmente durante a colheita (BRACKETT, 1999). Portanto, é de extrema importância sejam adotadas práticas higiênicas simples, como lavar as mãos após utilização de sanitários, tornando indispensável à realização de ações educativas sobre os preceitos básicos de higiene pessoal, visando sensibilizar essas pessoas em relação aos problemas acarretados aos consumidores pelos produtos provenientes de práticas inadequadas.

É provável que a estrutura física das hortaliças estudadas também contribua para a sua contaminação por *E. coli*, dentre outros microrganismos. O agrião, por exemplo, por possuir folhas múltiplas e separadas, permitindo uma maior fixação dos contaminantes. A alface possui folhas largas justapostas e flexíveis podendo ocorrer o contato com o solo durante o cultivo levando a um maior índice

de contaminação dependendo do sistema de cultivo (SILVA, ANDRADE, STAMFORD, 2005).

Surtos de toxinfecções alimentares têm sido associados com hortaliças contaminadas cultivadas em ambos os sistemas de produção – hidropônico e orgânico. Pesquisadores têm recuperado varias bactérias patogênicas para humanos desses produtos, tais como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *E. coli* O157:H7 (MCMAHON, WILSON, 2001; JOHANNESSEN, LONCAREVIC, KRUSE, 2002). As dificuldades de se localizar os focos contaminantes quando se trata de hortaliças frescas e as poucas informações científicas a respeito da magnitude dos riscos dentro de cada passo da cadeia produtiva desses vegetais, estão relacionadas a curta vida de prateleira desses alimentos (GARCIA-VILLANOVA, GALVEZ, 2000).

Ao contrário dos produtos de origem animal, os vegetais, especialmente os folhosos, são muitas vezes consumidos crus, sem um processamento que reduza ou elimine microrganismos patogênicos (ODUMERU et al., 1997). As atividades de higiene, limpeza e sanitização fazem parte do esquema de segurança sanitária dos locais de produção de alimento. Estes sistemas devem ser objetos de constante vigilância, pois a ocorrência de alguma falha poderá prejudicar o produto, principalmente quando se convertem em focos de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos (HOBBS, ROBERTS, 1998).

A qualidade e segurança de hortaliças consumidas *in natura* dependem de sua microbiota. Cada etapa percorrida entre o produtor e o consumidor final influenciará nos aspectos microbiológicos do produto. Portanto, o rastreamento em todas as fases de produção, transporte, distribuição, armazenamento e comercialização é uma alternativa para minimizar a contaminação das hortaliças por patógenos entéricos, possibilitando ao consumidor obter uma perfeita correlação entre o produto final e sua origem, permitindo a aquisição de um produto seguro e saudável (BRACKETT, SPLITTSTOESSER, 1992).

5.3 Características físico-químicas e rendimentos dos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre

A qualidade dos óleos essenciais depende de vários parâmetros tais como índice de refração, solubilidade em diferentes solventes orgânicos, densidade, dentre outros, os quais são utilizados para a avaliação da qualidade da matéria prima vegetal além do controle da identidade e da pureza do óleo. Os resultados referentes às propriedades físico-químicas e aos rendimentos (%) dos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre, respectivamente, estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados mostraram valores de 1,4987 e 0,9396 g/cm³ para o índice de refração e densidade do óleo essencial do manjeriço e de 1,4826 e 0,8282 g/cm³ para o óleo do gengibre. No que se refere à solubilidade em etanol 90%, os resultados demonstraram que o óleo de manjeriço foi solúvel na proporção de 1:1 e o do gengibre na proporção de 1:5. A cor apresentada pelos óleos essenciais das plantas utilizadas nesta pesquisa foi considerada como sendo típica, ou seja, amarelo pálido para o óleo do manjeriço e amarelo para o do gengibre.

Tabela 2. Características físico-químicas e percentuais de rendimento dos óleos essenciais do manjeriço (*Ocimum basilicum* Linn.) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe).

Parâmetros	Óleos Essenciais	
	<i>Ocimum basilicum</i> L.	<i>Zingiber officinale</i> R.
Índice de refração ($N_D^{25^\circ}$)	1,4987	1,4826
Densidade (g/cm ³) (25°C)	0,9396	0,8282
Solubilidade em etanol 90% (v/v)	1:1	1:5
Cor	Amarelo pálido	Amarelo
Transparência	Límpido	Límpido
Rendimento (%)	0,38	0,37

Angers, Morales e Simon (1996) investigando os óleos essenciais de diferentes espécies de *Ocimum*, relataram um índice de refração de 1,4795 para o

manjeriço. Já Hussain et al., (2008), obtiveram valores de 1,5045 e de 0,95g/cm³ para o índice de refração (25°C) e densidade (25°C) para o óleo essencial de manjeriço, respectivamente, resultados que corroboram com encontrados nesta pesquisa.

Tripathi, Dubey e Shukla (2008) obtiveram um índice de refração para o gengibre de 1.4842. No que diz respeito à densidade, Miyazawa e Kameoka (1988) ao determinarem os componentes voláteis do rizoma do gengibre obtiveram um valor de 0,9714 g/cm³, resultados semelhantes aos obtidos nesta pesquisa.

Segundo Özcan e Chalchat (2002) o rendimento do óleo essencial de diferentes variedades de plantas é dependente da variação sazonal e da localidade. Sendo assim, o baixo rendimento do óleo essencial do manjeriço (0,38%) pode ser atribuído ao fato da coleta das amostras da planta para a obtenção do óleo essencial tenha sido realizada no decorrer dos meses de agosto a novembro, período que corresponde à época de estiagem no Estado do Maranhão, onde as altas temperaturas podem ter favorecido a evaporação parcial de alguns constituintes do óleo.

Lachowicz et al., (1996) avaliando as características do óleo essencial de três variedades de manjeriço doce (tipo Reunião, folha de alface e anis) obtido por hidrodestilação cultivados na Austrália, obtiveram um rendimento de 0,38%, resultado semelhante ao encontrado nesta pesquisa.

Sartoratto et al., (2004) ao determinarem a composição e a atividade antimicrobiana do óleo essencial de plantas aromáticas usadas no Brasil, obtiveram um rendimento para o óleo essencial de manjeriço de 0,10% (p/p). Trevisan et al., (2006) ao caracterizarem os padrões de volatilidade e capacidade antioxidante do óleo essencial de diferentes espécies do gênero *Ocimum*, constataram que a quantidade de óleo essencial nas espécies de *Ocimum* foi variável, onde o maior rendimento foi atribuído a alfavaca (*Ocimum gratissimum*) (3,5%) e o menor ao manjeriço (0,5%) (*Ocimum basilicum* variedade *purpurascens*). Chalchat e Özcan (2008) em um estudo comparativo do óleo essencial das flores, folhas e caules do manjeriço usado como erva medicinal constataram que o rendimento do óleo foi de 0,5%, 1,0% e 0,05% (v/p), respectivamente.

Politeo, Jukic e Milos (2007) obtiveram um rendimento de 0,62% para o óleo essencial das partes aéreas do manjeriço extraído por hidrodestilação. Bozin et al., (2006) relataram que o rendimento dos óleos essenciais de manjeriço obtidos

a partir de plantas cultivadas em Servia e Montenegro foi de 0,37%. Enquanto nos manjericões variedades púrpura e verde cultivados no Iran, os rendimentos dos óleos essenciais foram de 0,20% e 0,50%, respectivamente (SAJJADI, 2006), dados que corroboram com os obtidos nesta pesquisa.

O percentual de rendimento do óleo essencial de gengibre obtido após quatro horas de extração mostrou-se baixo (0,37%) quando comparado ao obtido por Maia, Bovi e Duarte (1991), os quais após uma extração de sete horas, os rendimentos ficaram no intervalo de 0,56-0,92%. Já Tripathi, Dubey e Shukla (2008) obtiveram um rendimento de 0,8% para o óleo de gengibre, valor inferior ao encontrado nesta pesquisa. Norajit, Laohakunjit e Kerdchochuen (2007) ao avaliarem o efeito antibacteriano do óleo essencial de cinco espécies pertencentes à família *Zingiberaceae*, obtiveram um rendimento de 0,27% para o óleo essencial do gengibre pelo método de hidrodestilação.

Onyenekwe e Hashimoto (1999) avaliaram a composição do óleo essencial do gengibre nigeriano e, após seis horas de extração, alcançaram um rendimento de 2,4%. Sendo assim, o tempo de quatro horas de destilação executado para a obtenção do óleo essencial de gengibre pode ter afetado no rendimento do óleo.

5.4 Composição química dos óleos essenciais do manjericão e do gengibre obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) permitiram o conhecimento da composição química e a abundância relativa dos principais componentes presentes nos óleos essenciais do manjericão e do gengibre. Na Tabela 3 são apresentados os constituintes identificados no óleo essencial do manjericão, listados por ordem de tempo de retenção.

No óleo essencial do manjericão foram identificados cerca de seis componentes como sendo os principais constituintes do óleo com um percentual de abundância significativo, sendo o metil chavicol ou estragol (1-metoxi-4-(2-propenil)-benzeno) identificado como o constituinte majoritário correspondendo a 62,39% do

óleo. O linalol, o α -farneseno e o eucaliptol (1,8-cineol) foram o segundo, terceiro e quarto constituinte mais abundante, respectivamente.

Tabela 3. Principais constituintes do óleo essencial do manjericão (*Ocimum basilicum* Linn.).

Pico ¹	tr ² (min.)	Componentes	% A ³	Qualidade ⁴
1	15,66	Eucaliptol	3,48	AMDIS
2	18,50	Linalol	25,88	94
3	21,32	α -Terpineol	1,43	AMDIS
4	22,16	Metil chavicol	62,39	94
5	20,12	α -Farneseno	6,14	93
6	36,21	α -Cadinol	0,67	84

Nota: ¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ²tr: Tempo de retenção dos composto na coluna em minutos; ³%A: Porcentagem da área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos componentes na amostras; ⁴Qualidade: índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registros nas bibliotecas utilizadas. Adotam-se sempre índices de qualidade >70; AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System): programa utilizado para a interpretação dos espectros de massas quando havia diferenças significativas entre o espectro de massas obtido e o encontrado na biblioteca do CG/EM.

Após a análise de CG/EM realizada com o óleo essencial do gengibre e posteriores comparações dos resultados com os dados da biblioteca do instrumento e a dedução dos fragmentos, foram identificados 18 compostos voláteis predominantes no óleo (Tabela 4). O α -zingibereno foi identificado como o constituinte majoritário correspondendo a 27,14% do total do óleo. Dentre os demais constituintes de abundância significativa no óleo estão: o geranial (*E*-citral) (14,06%), nerolidol (13,51%), neral (*Z*-citral) (9,64%), sesquifelandreno (9,45%), sabineno (5,23%), canfeno (5,02%), 1,8-cineol (4,35%) e o ar-curcumeno (1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil-benzeno) (3,33%).

Tabela 4. Principais constituintes do óleo essencial do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe).

Pico ¹	tr ² (min.)	Componentes	% A ³	Qualidade ⁴
1	11,52	α -Pineno	1,46	AMDIS
2	12,17	Canfeno	5,02	90
3	14,14	β -Mirceno	1,29	86
4	15,76	Sabineno	5,23	91
5	15,66	1,8-Cineol	4,35	83
6	18,48	Linalol	0,50	AMDIS
7	21,59	4,4-Dimetil-2-pentinal	0,80	78
8	23,22	terc-Dodeciltiol	0,71	79
9	23,65	Neral	9,64	94
10	24,13	Nerol	1,07	90
11	24,70	Geranial	14,06	95
12	25,48	2-Undecanona	0,63	89
13	28,47	Farnesol	1,27	74
14	30,05	1,1-Diciclopropiletileno	0,55	74
15	31,59	ar-Curcumeno	3,33	87
16	31,99	α -Zingibereno	27,14	92
17	32,37	Nerolidol	13,51	92
18	32,83	β -Sesquifelandreno	9,45	92

Nota: ¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ²tr: Tempo de retenção dos composto na coluna em minutos; ³%A: Porcentagem da área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos componentes na amostras; ⁴Qualidade: índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registros nas bibliotecas utilizadas. Adotam-se sempre índices de qualidade >70; AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System): programa utilizado para a interpretação dos espectros de massas quando havia diferenças significativas entre o espectro de massas obtido e o encontrado na biblioteca do CG/EM.

Os cromatogramas obtidos após a análise de CG/EM dos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre estão apresentados nas Figuras 23 e 24. Os picos cromatográficos foram identificados através da comparação dos respectivos espectros de massa com os dados das espectrotecas (1) WILEY 139; (2) NIST107 e (3) NIST21.

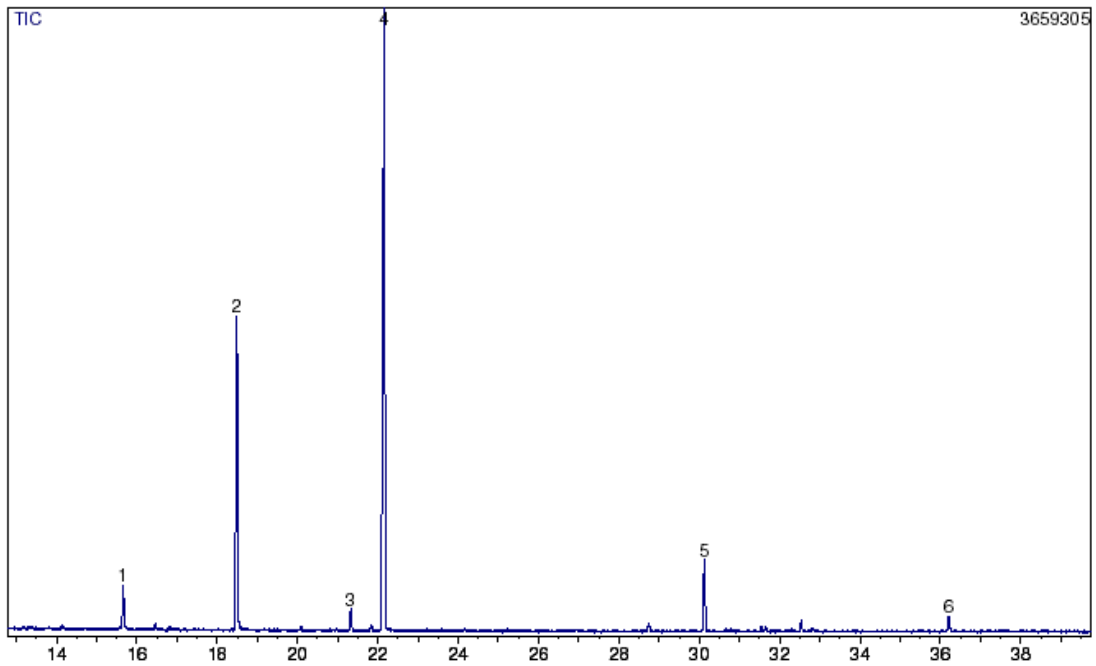


Figura 23. Cromatograma do óleo essencial do manjericão

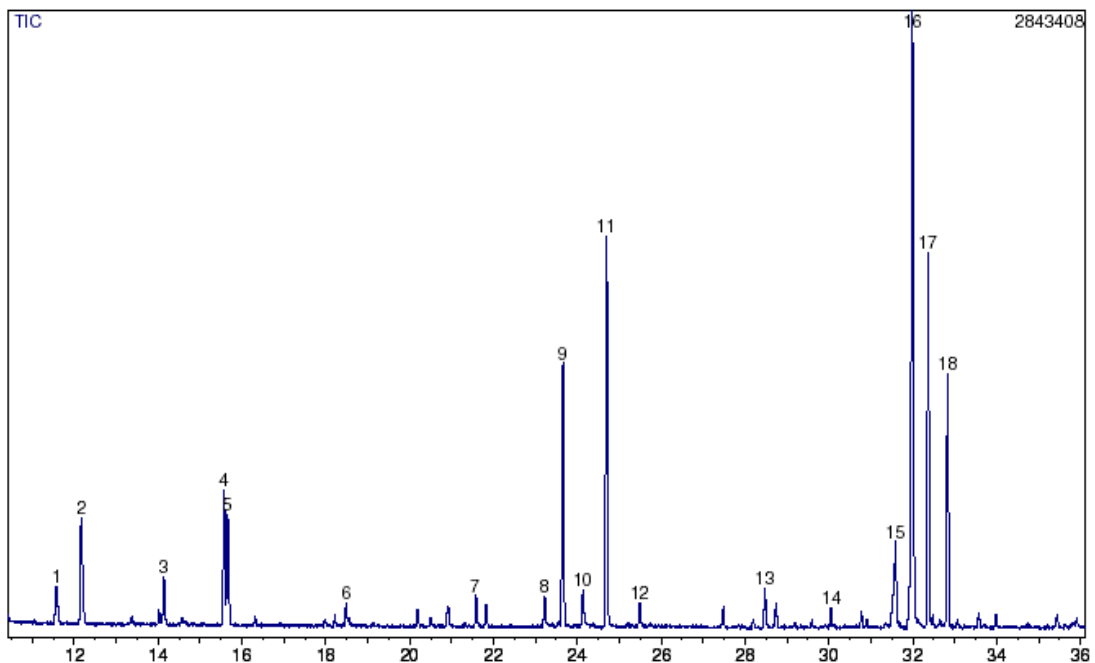


Figura 24. Cromatograma do óleo essencial do gengibre

As Figuras 25,26,27,28 e 29, correspondem aos espectros de massas referentes aos cinco principais picos apresentados pelo óleo essencial do manjericão no CG/EM em ordem decrescente de percentual de abundância relativa (%) no óleo.

O pico 4 do cromatograma (Figura 23) com o tempo de retenção em 22,16min. corresponde ao componente majoritário do óleo do manjeriço, o metil chavicol (1-metóxi-4-(2-propenil)-benzeno). A Figura 25 contém o espectro de massa referente a este pico, onde o íon molecular $[M^{*+}]$ mostra a relação $m/z = 148$, que representa a fórmula molecular do metil chavicol $C_{10}H_{12}O$.

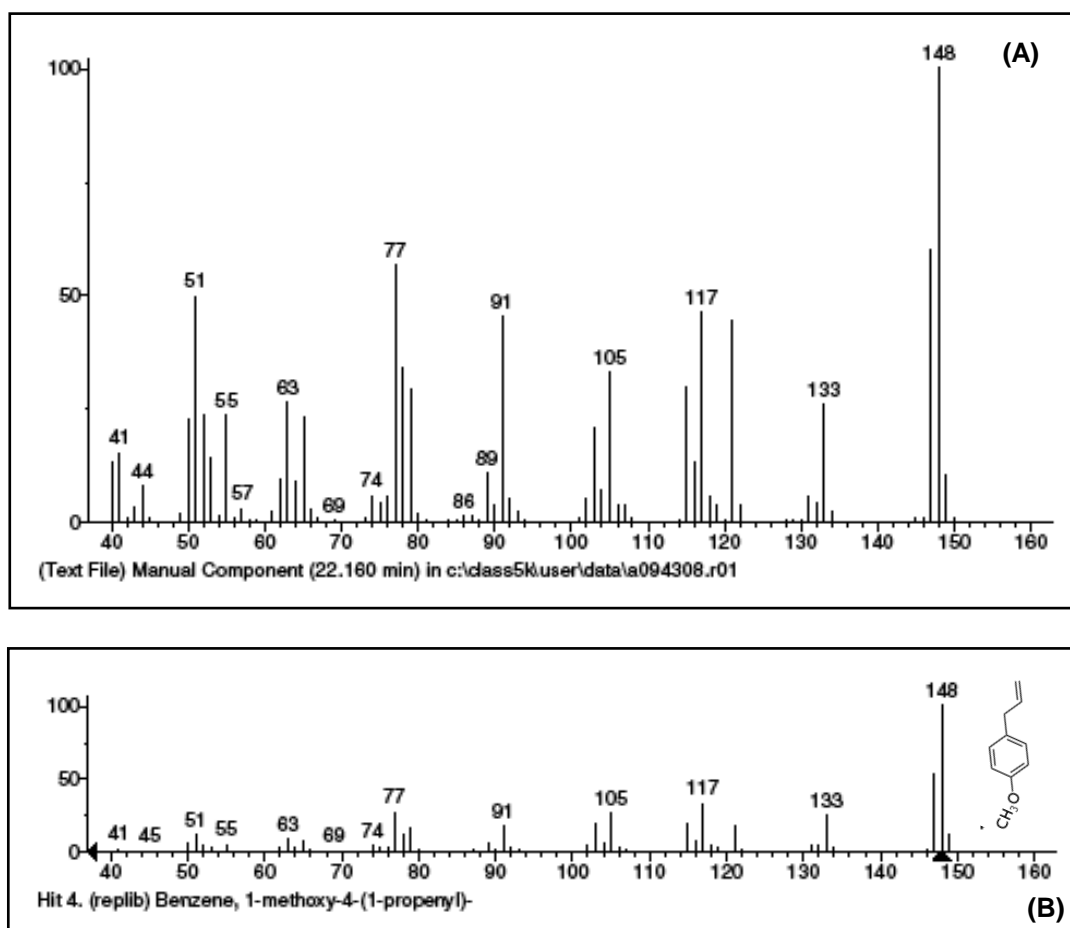


Figura 25. Espectro de massas do composto do pico 4 do cromatograma da Figura 23 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas do manjeriço. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa.

O espectro de massas da Figura 26 indica a presença do linalol, pico 2 no CG/EM (Figura 23), o segundo componente de maior abundância no óleo de manjeriço. O pico do íon molecular $m/z = 154 [M^{*+}]$ (o qual não aparece no espectro por causa da sua instabilidade), corresponde à fórmula $C_{10}H_{18}O$ do componente linalol. Já o pico 136 $[M^{*+} - 18]$ corresponde à perda de água, enquanto o pico $m/z = 121 [M^{*+} - 18 - 15]$ é correspondente à perda de água e do grupo metila (ADAMS, 1995).

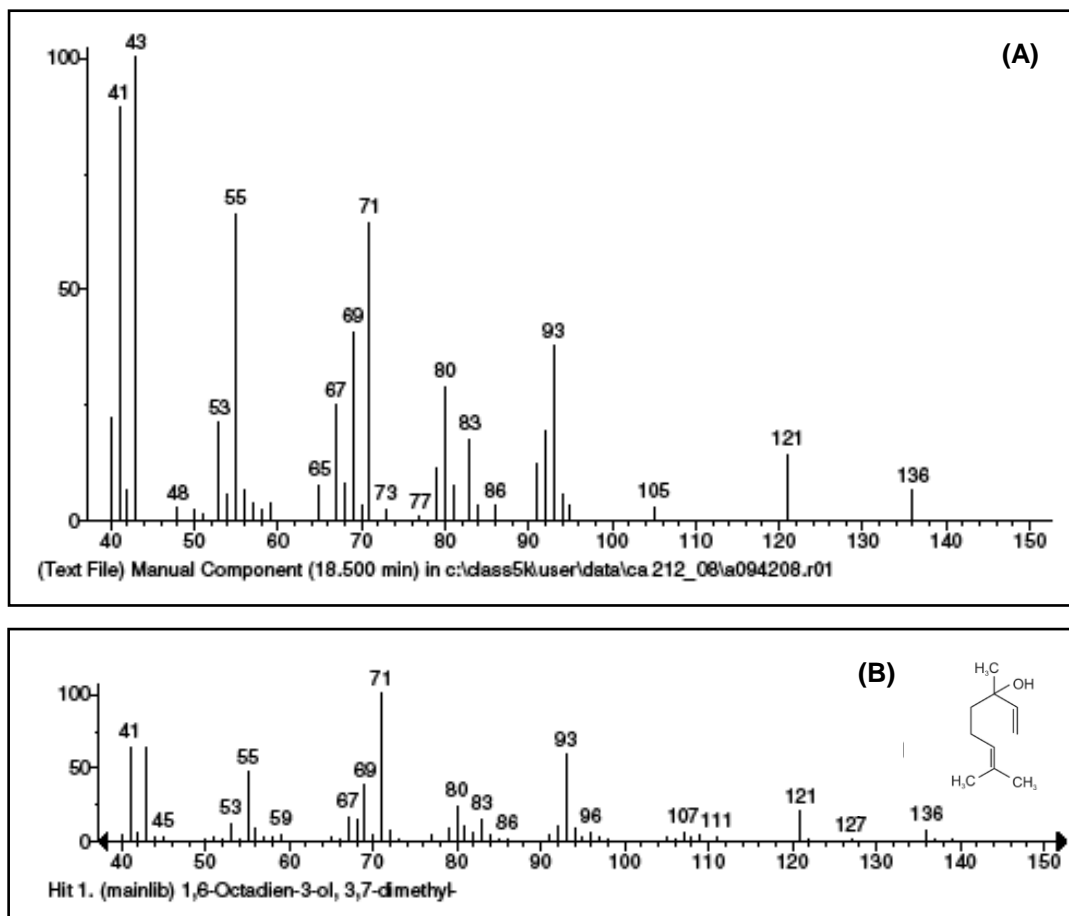


Figura 26. Espectro de massas do composto do pico 2 do cromatograma da Figura 23 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas do manjericão. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST 21 do programa.

Observando-se a Figura 27, percebe-se que o pico do íon molecular $m/z = 204 [M^{*+}]$ (o qual não aparece no espectro por causa da sua instabilidade), corresponde à fórmula $C_{15}H_{24}$ do componente do pico 5 da Figura 23, referente ao α -farneseno. O pico $m/z = 161 [M^{*+}-43]$ representa a perda do propil, além disso, a diferença constante de valores para a relação m/z de 14 unidades e aglomerados de picos mais intensos da série C_nH_{2n-1} é característica de hidrocarbonetos (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).

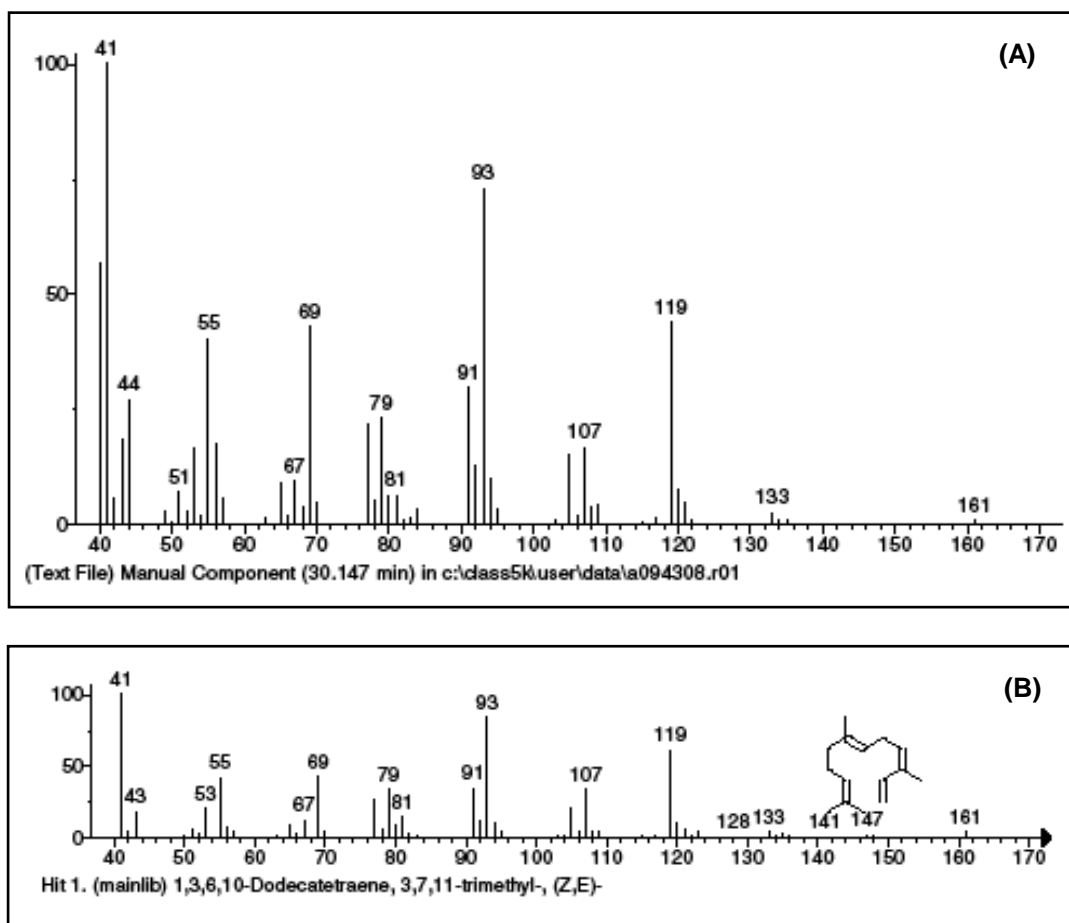


Figura 27. Espectro de massas do composto do pico 5 do cromatograma da Figura 23 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas do manjeriço. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST 107 do programa.

O espectro de massa referente ao pico 1 (Figura 23) está representado na Figura 28. Nesse caso, o íon-molecular [M^{*+}] está situado no ponto em que ocorre a relação $m/z = 154$, afirmando a fórmula $C_{10}H_{18}O$, que caracteriza o composto comumente conhecido por eucaliptol (ADAMS, 1995). É um pico pouco intenso, o que é característico de éteres alifáticos. O pico $m/z = 139$ [$M^{*+}-15$] é característico da perda do grupo metila, ao passo que o pico $m/z = 108$ [$M^{*+}-18-28$] caracteriza perda de uma molécula de água seguida pela de etileno.

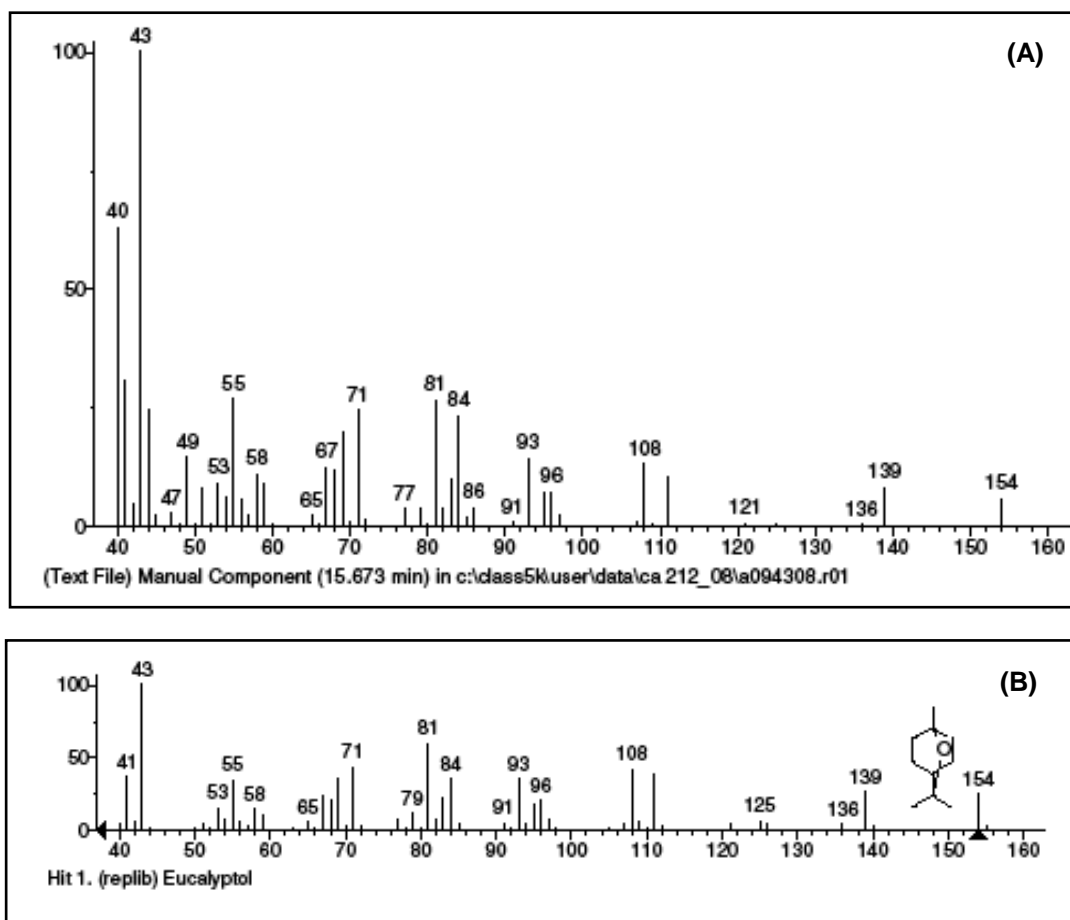


Figura 28. Espectro de massas do composto do pico 1 do cromatograma da Figura 23 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas do manjerição. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca AMDIS do programa.

Observando-se a Figura 29 percebe-se que o pico do íon molecular $m/z = 154 [M^{*+}]$ (o qual não aparece no espectro por causa da sua instabilidade), corresponde à fórmula $C_{10}H_{18}O$ do componente do pico 3 da Figura 23, o álcool terciário conhecido como α -terpineol (ADAMS, 1995). O pico $m/z = 139 [M^{*+} - 15]$ é correspondente à perda do grupo metila, enquanto o pico $m/z = 136 [M^{*+} - 18]$ é devido à perda de água, que frequentemente ocorre pela decomposição térmica de álcoois superiores nas paredes quentes da câmara de injeção (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).

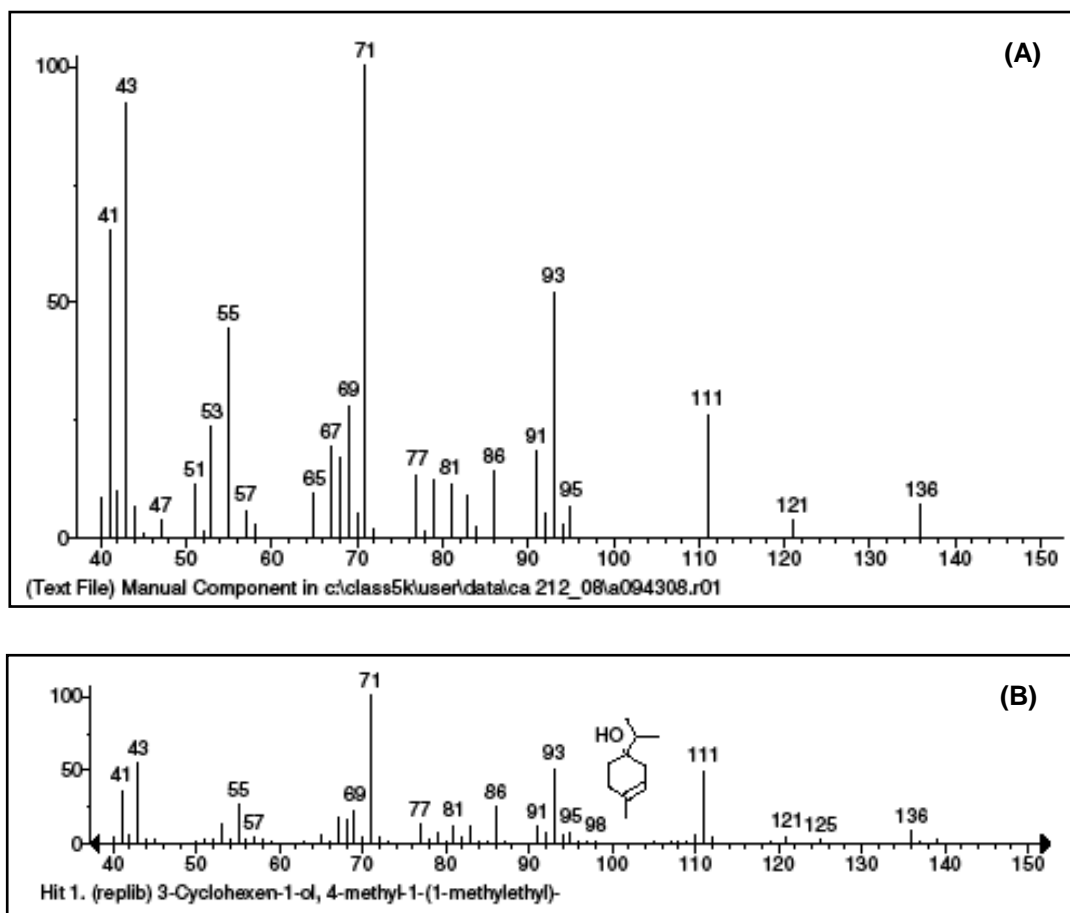


Figura 29. Espectro de massas do composto do pico 3 do cromatograma da Figura 23 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas do manjeriço. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca AMDIS do programa.

Os espectros de massas correspondentes cinco constituintes majoritários identificados no óleo essencial do gengibre pela CG/EM na ordem decrescente de percentual de abundância relativa (%) no óleo, são mostrados nas Figuras 30, 31, 32, 33 e 34.

O pico 16 no cromatograma da Figura 24, com tempo de retenção de 31,99 min. equivale ao composto α -zingibereno, constituinte majoritário do óleo essencial de gengibre. Na Figura 30 é mostrado o espectro de massa referente a esse pico, no qual, o íon molecular $[M^{+}]$ apresenta a relação $m/z = 204$, confirmando a fórmula $C_{15}H_{24}$, que caracteriza o composto como zingibereno (ADAMS, 1995). O pico intenso em $m/z = 119$ $[M^{+} - 85]$ caracteriza a perda do grupamento hexil (C_6H_{13}) radical monovalente derivado da molécula de hexano presente na fórmula estrutural do zingibereno. Enquanto, o pico em $m/z = 91$ indica a formação de um anel de

benzeno com cadeia lateral alquila. O íon de massa 91 é denominado de cátion tropílio (MATA et al., 2004; SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).

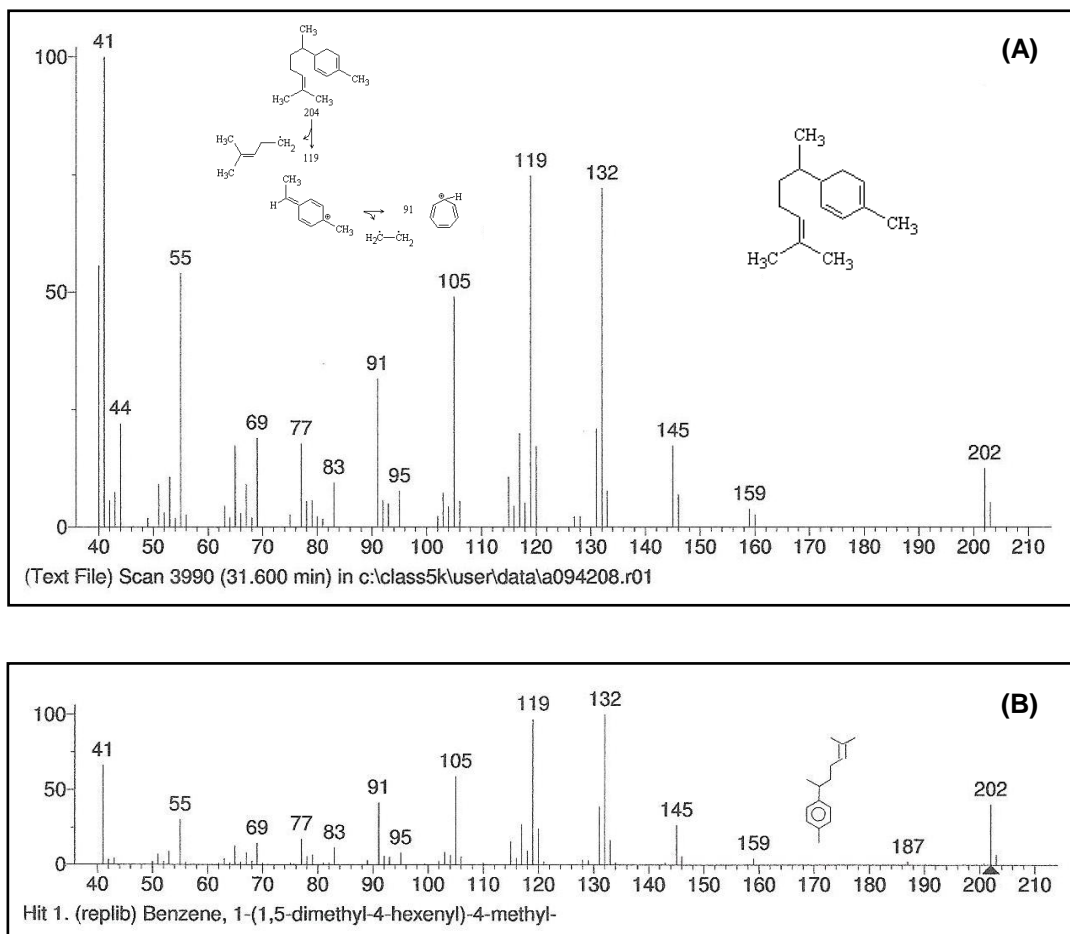


Figura 30. Espectro de massas do composto do pico 16 do cromatograma da Figura 24 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST21 do programa.

O espectro de massas apresentado na Figura 31 é referente ao pico 11 mostrado no cromatograma do óleo essencial do gengibre. O pico do íon molecular $m/z = 152$ [M^{*+}], confirmando como $C_{10}H_{16}O$ a fórmula do geranial.

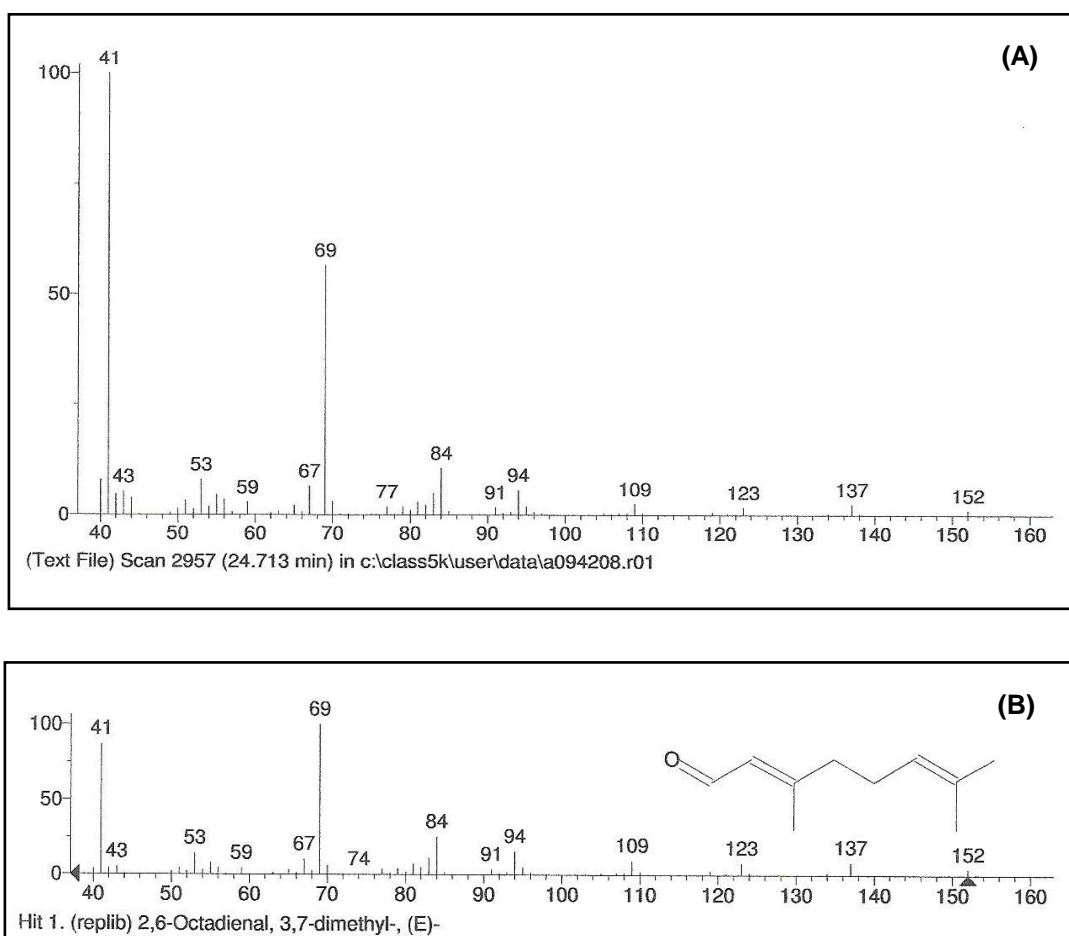


Figura 31. Espectro de massas do composto do pico 11 do cromatograma da Figura 24 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa.

Na Figura 32 verifica-se o espectro de massas referente ao pico 17 do cromatograma apresentado na Figura 24. O pico do íon molecular $m/z = 222$, equivale a $C_{15}H_{26}O$ a fórmula molecular do nerolidol. A ausência do pico do íon molecular no espectro pode ser em decorrência da instabilidade desse álcool. O pico $m/z = 204 [M^{*+} - 18]$ é provavelmente resultante da perda de uma molécula de H_2O .

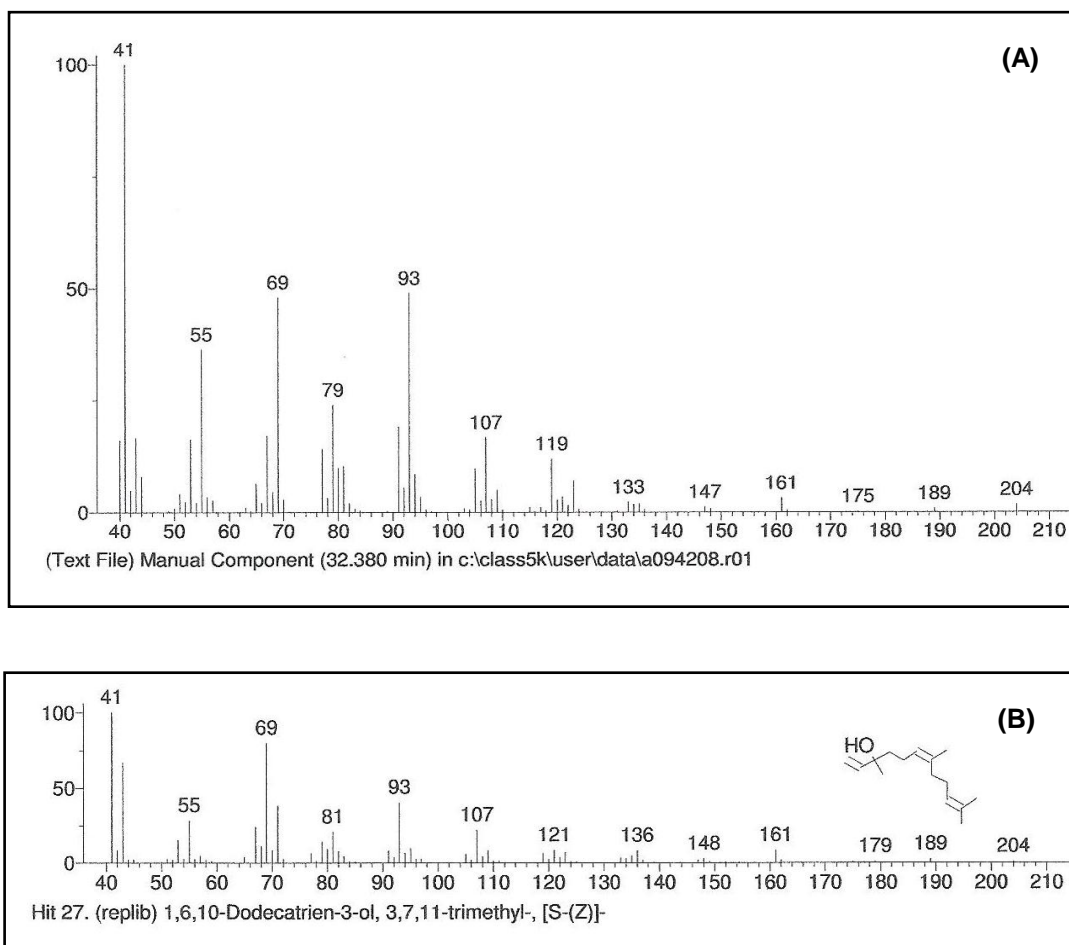


Figura 32. Espectro de massas do composto do pico 17 do cromatograma da Figura 24 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa.

As Figuras 33 e 34 apresentam os espectros de massas dos picos 9 e 18 do cromatograma da Figura 24.

De acordo com os espectros, os picos foram identificados como sendo o neral e o β -sesquifelandreno, o quarto e o quinto constituinte mais abundante no óleo essencial do gengibre, respectivamente. Percebe-se que o pico do íon molecular $m/z = 152$ [M^{*+}] (o qual não aparece no espectro por causa da sua instabilidade), corresponde à fórmula $C_{10}H_{16}O$ do componente do pico 9, identificado como sendo o neral. O pico 137 [$M^{*+} - 15$] corresponde à perda de uma metila (CH_3). Já o pico do íon molecular $m/z = 204$ do cromatograma, refere-se à fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ relativa ao β -sesquifelandreno.

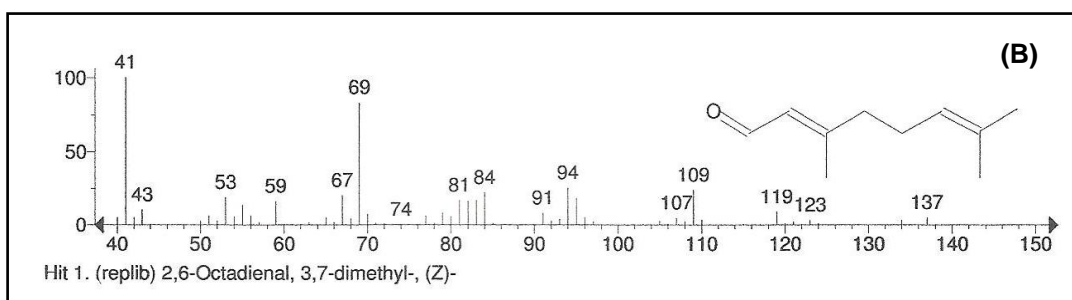
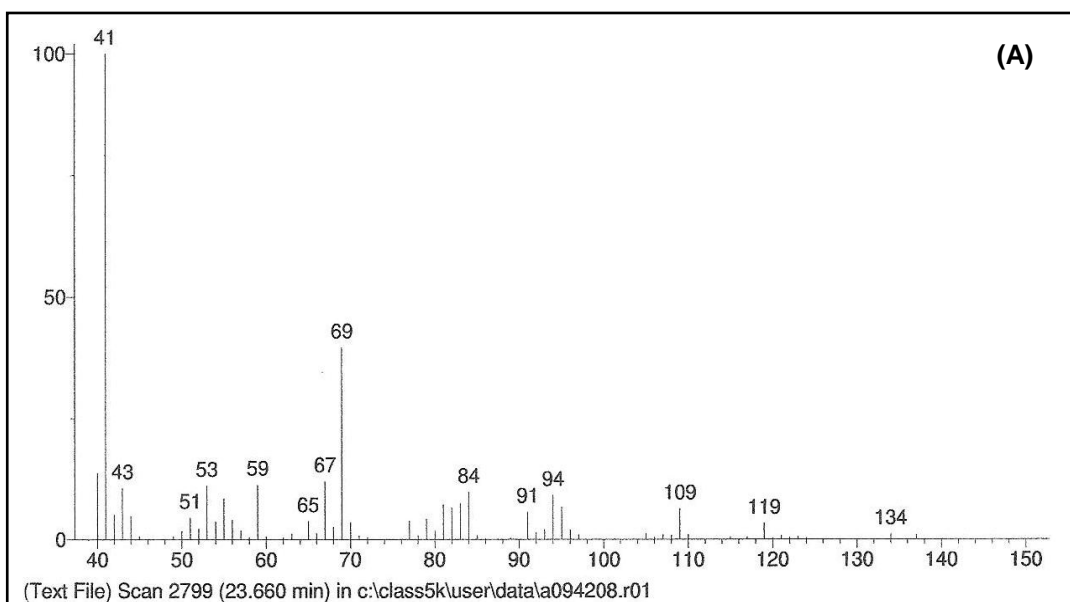
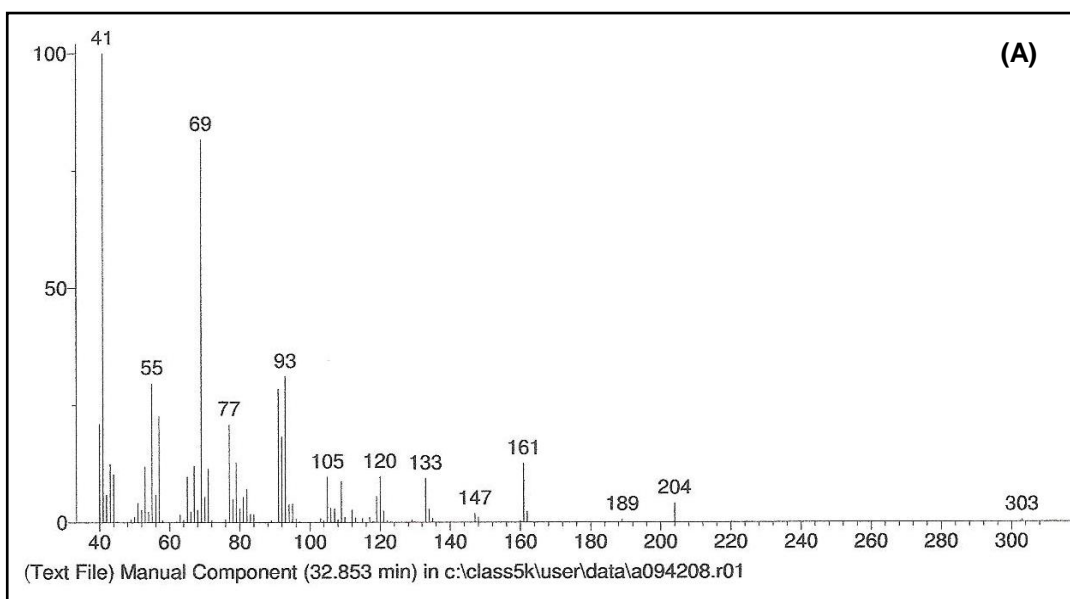


Figura 33. Espectro de massas do composto do pico 9 do cromatograma da Figura 24 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST21 do programa.



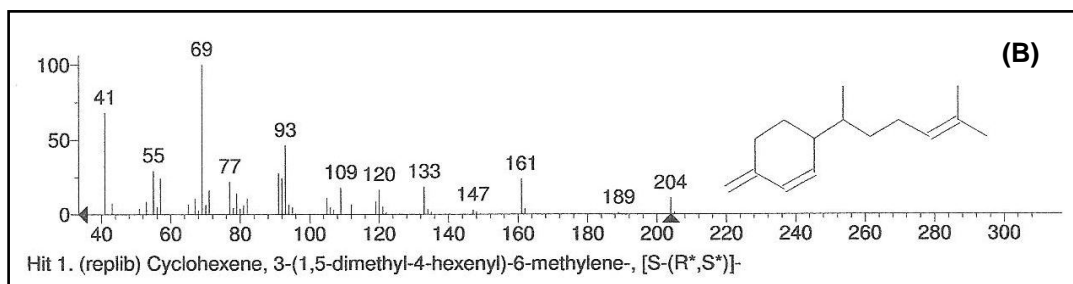


Figura 34. Espectro de massas do composto do pico 18 do cromatograma da Figura 24 e sua proposta de identificação. (A) Espectro de massas do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST107 do programa.

As análises químicas dos óleos essenciais de derivados de manjeriço tem sido o objeto de muitos estudos com resultados variando de país para país. A frequente variação na composição química do óleo essencial dessa planta pode ser atribuída ao polimorfismo do manjeriço, o qual por sua vez é causado pela hibridização inter e intra-específica (GRAYER et al., 1996; PATON, PUTIEVSKY, 1996).

Suppakul et al., (2003) relataram sobre a variação da composição química do óleo essencial do manjeriço em função do país de origem. Neste relato os autores comentaram que no Brasil a composição química desse óleo pode variar entre o linalol (49,73%), 1,8-cineol (22%), metil chavicol (47%), metil -(E)-cinamato (65,5%), em Cuba, metil chavicol (66,75%), 1,8-cineol (5,44%), linalol (4,95%), α -bisaboleno (3,60%), α -bergamoteno (2,96%), na Alemanha, metil chavicol (86,1%), Itália, linalol (70%), 1,8-cineol (13%) e na República de Guiné, geralmente a composição do óleo de manjeriço varia entre o linalol (69%), eugenol (10%) trans- α -bergamoteno (3%) e o timol (2%).

Em uma pesquisa realizada por Vieira e Simon (2000) os quais caracterizaram espécies de *Ocimum* encontradas em mercados e usadas na medicina pela população brasileira, dentre as quais estavam o *Ocimum americanum* L., *O. basilicum* L., *O. campenchanum* L., *O. gratissimum* e *O. selloi* Benth, constataram que, quimicamente, o *Ocimum gratissimum* apresentou alto percentual de eugeno (40-60%) e timol (31%), *O. campenchanum* L. apresentou alto teor de 1,8-cineol (62%) e β -cariofileno (78,7%) e para o *Ocimum basilicum* foram encontrados: linalol (49,7%), metil chavicol (47%) e cinamato de metila (65,5%), 1,8-

cineol (22%). *O. americanum* apresentou alto teor de cinamato de metila (>90%) e o *O. selloi* tem como principal constituinte o metil chavicol (\pm 40%).

Kasali et al., (2004) pesquisando a composição de óleos voláteis de novos quimiotipos de manjeriço na Nigéria, utilizando o método de hidrodestilação para a extração do óleo e a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas para a identificação dos componentes, observaram que, entre os vinte e quatro componentes, representando 95% do total do óleo, o metil chavicol (60,3%), o linalol (10,8%) e o (*Z*)-metil cinamato (6,3%) foram identificados como os constituintes majoritários. Outros compostos notados incluíam o 1,8-cineol (3,1%) e o β -pineno α -pineno (2,7%).

Sajjadi (2006) realizando análises dos óleos essenciais de dois cultivares de manjeriço originários do Iran, o púrpura e o verde, após as análises de CG-EM, identificaram vinte componentes em cada uma das respectivas variedades (98,5% e 99,4% do total do óleo, respectivamente). Entre os constituintes majoritários encontrados no óleo do manjeriço púrpura estavam o metil chavicol (52,4%), linalol (20,1%), epi- α -cadinol (5,9%), trans- α -bergamoteno (5,2%) e 1,8-cineol (2,4%). No óleo essencial da variedade verde, encontraram o metil chavicol (40,5%), geranial (27,6%), neral (18,5%) e o óxido de cariofileno (5,4%). Esses resultados assemelham-se aos obtidos nesta pesquisa no que se refere à presença do metil chavicol como componente majoritário do óleo.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são semelhantes aos encontrados por Chalchat e Özcan (2008) que ao analisarem a composição do óleo essencial extraído de três diferentes partes do manjeriço (flores, folhas e caule) na Turquia, constataram que o componente majoritário do óleo extraído das folhas foi o metil chavicol com um percentual de 52,60%, seguido pelo limoneno (13,64%), acetato de fenila (10,99%) e α -felandreno (4,15%).

Trevisan et al., (2006) comentaram sobre a presença do linalol, metil chavicol e 1,8-cineol como sendo os principais constituintes do manjeriço cultivado em Fortaleza/Ce, com percentuais de 42,5%, 33,1% e 11,0%, respectivamente.

Em pesquisa realizada por Lachowicz et al., (1996) com três variedades de manjeriço doce, constatou-se que o metil chavicol e o linalol foram identificados como os componentes majoritários dos óleos. A variedade Reunião continha 87% de metil chavicol e 1% de linalol, porém o manjeriço tipo folha de alface apresentou 46% de linalol e 25% de metil chavicol e o tipo anis com 30% de linalol e 49% de

metil chavicol, resultados similares aos encontrados por Simon et al., (1990) (30% de linalol e 47% de metil chavicol) e aos encontrados nesta pesquisa.

De acordo com Khatri et al., (1995) o metil chavicol (87,3%) foi o componente majoritário do óleo essencial do manjeriço doce avaliado para a exploração comercial no Paquistão, seguido do linalol (5,4%), metil eugenol (1,5%), β -cariofileno (2,4%), α -pineno (1,0%), β -pineno (0,8%), limoneno (0,5%) e canfeno (0,2%). Bozin et al., (2006) realizaram pesquisa para a caracterização da composição volátil e para avaliar as atividades antimicrobianas e antioxidantes de óleos essenciais de algumas espécies de *Lamiaceae*, constataram que, o metil chavicol (45,8%) e o linalol (24,2%) foram os constituintes majoritários do óleo essencial do manjeriço, resultados que corroboram com os encontrados nessa pesquisa.

Segundo Lachowicz et al., (1998) o método pelo qual o óleo essencial de manjeriço é extraído tem significativo efeito sobre a composição química dos componentes majoritários do óleo. Esses autores relataram ainda que o óleo essencial obtido pelo processo de hidrodestilação contém porção significativamente alta de hidrocarbonos de baixo ponto de ebulição tais como, o α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, α -terpineno, limoneno, γ -terpineno, *p*-cimeno e terpenos oxigenados, incluindo o 1,8-cineol.

O óleo essencial do manjeriço cultivado em São Luís/MA e analisado nessa pesquisa apresentou uma quantidade elevada de metil chavicol (62,39%) e linalol (25,88%) confirmando os dados relatados pela literatura no que se refere aos componentes majoritários encontrados por outros pesquisadores no referido óleo essencial. Estes resultados evidenciam ainda que, a composição do óleo essencial das diferentes espécies do gênero *Ocimum* pode variar significativamente dependendo da região geográfica, condições climáticas, variedade e idade da planta, método de secagem e o método de extração do óleo (JERKOVIĆ, MASTELIĆ, MILOS, 2001).

Baseado em mais de 200 análises de óleos essenciais extraídos a partir do manjeriço, Lawrence (1988) classificou os quatro principais quimiotipos de óleo essencial de manjeriço como: (1) quimiotipo metil chavicol, (2) linalol, (3) metil eugenol e (4) metil cinâmico, e também numerosos subtipos. Esta mesma classificação foi adotada por Koba et al., (2009) após a realização de um estudo

para a determinação da composição química e propriedades antimicrobianas de diferentes quimiotipos de óleos essenciais de manjeriço originários do Togo (França). Usando o método de classificação descrito por Lawrence o óleo essencial do manjeriço cultivado em São Luís/MA foi classificado como pertencente ao quimiotipo metil chavicol por apresentar 62,39% deste componente em sua composição.

O manjeriço quimiotipo metil chavicol, é utilizado na indústria de perfumes e alimentos. Além disso, este quimiotipo tem sido indicado como um possível pesticida contra larva e adultos de *Callosobruchus maculatus*, principal praga do feijão *Vigna unguiculata* armazenado (KEITA et al., 2001; KETOH, GLITOH, HUIGNARD, 2002). Este quimiotipo tem o odor semelhante ao de erva-doce e anil. Interessantemente, o metil chavicol é também o componente chave dos óleos essenciais de plantas aromáticas pertencentes a diferentes famílias tais como o anil-estrela (*Illicium verum* Hook. F., *Magnoliaceae*), erva-doce amarga (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*, *Apiaceae*) e estragão (*Artemisia dracuncululus* L., *Asteraceae*) (LEWINSOHN et al., 2001).

Os resultados encontrados na presente pesquisa quanto à composição química do óleo essencial do gengibre revelaram que os mesmos foram semelhantes aos obtidos por Onyenekwe e Hashimoto (1999) que ao analisarem a composição do óleo essencial do gengibre nigeriano constataram que o zingibereno foi o componente majoritário com 29,54% do total do óleo. Outros compostos como o β -sesquifelandreno (18,42%), α -pineno (0,21%), canfeno (0,61%) e sabineno (traços) também foram identificados. Singh et al., (2008) investigando sobre as atividades química, antioxidante e antimicrobiana do óleo e oleoresinas do gengibre identificaram cinquenta e sete componentes, representando cerca de 92,7% do total do óleo, dentre estes o geranial (25,9%), α -zingibereno (9,5%), (E,E)- α -farneseno (7,6%), neral (7,6%), curcumeno (6,6%), β -sesquifelandreno (5,1%), 1,8-cineol (1,9%) dentre outros.

Yu et al., (2007) ao analisarem os componentes do óleo essencial do gengibre fresco pela cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa identificaram cerca de cinquenta e quatro compostos os quais incluíam o β -felandreno (22,84%), α -zingibereno (15,48%), canfeno (7,30%), β -sesquifelandreno (5,54%), geranial (5,25%), e o α -pineno (2,13%). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Chrubasik, Pittler e Roufogalis (2005) que

analisando o óleo essencial de gengibre usando a mesma técnica (CG-EM) identificaram sessenta e seis compostos dos quais o canfeno o β -felandreno e o 1,8 cineol foram os componentes majoritários. Outros constituintes incluindo o zingibereno, β - bisaboleno, β -sesquifelandreno e o α -farneseno acíclico também foram identificados.

Natta et al., (2008) analisaram por CG/EM os óleos essenciais de cinco espécies da família *Zingiberaceae*, obtido por hidrodestilação, a serem posteriormente avaliados quanto ao seu potencial antibacteriano frente a bactérias de origem alimentar, constataram a presença de nove componentes que apresentaram relativa abundância, dentre estes estão: zingibereno componente majoritário com 30,7%, seguido pelo β -farneseno (15,2%), geranial (15,1%), β -sesquifelandreno (11,3%), neral (10,2%), β -bisaboleno (6,9%), curcumeno (6,3%), calminol (1,4%) e o metil chavicol (1,2%), resultados semelhantes aos encontrados nessa pesquisa.

Toure e Xiaoming (2007) realizaram análises cromatográficas dos óleos essenciais do gengibre guinéu e chinês. Os resultados demonstraram que o zingibereno foi o componente majoritário identificado com um percentual de abundância de 19,89% e 31,1% para o óleo essencial do gengibre originário de Guiné e da China, respectivamente.

Bartley e Jacobs (2000) obtiveram um percentual zingibereno de 13,44% no gengibre australiano usando o dióxido de carbono supercrítico para a extração do óleo. Além do zingibereno, outros constituintes do óleo foram identificados tais como: β -sesquifelandreno (8,95%), canfeno (8,10%), citral (3,44%), α -pineno (2,70%), 1,8-cineol (1,43%), β -mirceno (1,37%) e o nerolidol (0,46%) no óleo do gengibre guinéu e o β -sesquifelandreno (13,82%), canfeno (4,27%), 1,8-cineol (1,86%), α -pineno (1,30%), β -mirceno (0,56%), nerolidol (0,48%), farnesol (0,47%), 2-undecanona (0,35%) e o citral (0,34%) no óleo chinês. Estes compostos, juntamente com os seus respectivos percentuais de abundância, estão de acordo com os identificados no óleo essencial do gengibre comercializado na cidade de São Luís (MA) utilizado nessa pesquisa.

Langner, Greifenberg e Gruenwald (1998) relataram que os componentes do óleo essencial de gengibre são caracterizados como sendo pertencentes principalmente ao grupo dos monoterpenoides (β -feniladreno, canfeno, cineol,

geraniol, curcumeno, citral, terpineol, borneol) e sesquiterpenoides (α -zingibereno (30-70%), β -sesquifelandreno (15-20%), β -bisaboleno (10-15%), α -farneseno, ar-curcumeno, zingiberol). Martins et al., (2001) identificaram em duas amostras de óleo essencial do gengibre o zingiberene, bisabolene, curcumene, neral, geranial e mostraram que estes compostos possuem atividades antimicrobianas frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, leveduras e fungos filamentosos. O sesquiterpeno hidrocarbono, zingibereno, identificado como o componente majoritário do óleo essencial extraído do rizoma do gengibre avaliado nesta pesquisa, de acordo com Millar (1998) tem demonstrado ter um considerável espectro de atividade biológica (antimicrobiana, antiviral e antiulcera), além de ser amplamente utilizado em cosméticos e fragrâncias.

Morgan (1994) descreve que sob a epiderme ou casca do gengibre, encontra-se um tecido constituído por numerosas glândulas de óleo resinosas onde se encerra a maior parte dos princípios ativos que a planta contém. Esse autor descreve ainda que, grande parte das atividades farmacológicas encontradas na planta do gengibre é isolada do rizoma e algumas frações de seus princípios ativos são: zingibereno, citral, 1,8-cineol, zingerona, gingerol, bisaboleno, geraniol, acetato de geranila, shogaol, zingiberol, canfeno, felandreno, borneiol, lilanol, acetatos e caprilatos de zingiberol, aldeídos e cetonas.

No cromatograma obtido dos componentes do óleo essencial de gengibre analisado nesta pesquisa (Figura 24), não foram identificadas as substâncias responsáveis pela pungência do gengibre, gingerol e shagol. Provavelmente, o processo empregado para obtenção do óleo essencial, hidrodestilação, promoveu a degradação térmica desses compostos, já que são comprovadamente termolábeis e raramente encontrados no gengibre fresco (BHATTARAI, TRAN, DUKE, 2001).

Nos últimos anos os óleos essenciais e extratos de ervas têm atraído um grande interesse científico devido a seu potencial como fonte de antioxidantes naturais e compostos biologicamente ativos (BOZIN et al., 2006; TEPE et al., 2007). As atividades antimicrobianas e antioxidantes dos óleos essenciais têm formado a base de muitas aplicações, como por exemplo, alimentos processados e frescos, formulações farmacêuticas, na medicina alternativa e em terapias naturais (CELIK TAS et al., 2007).

5.5 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de alfaces e agrião cultivados pelos sistemas orgânico e hidropônico

Nessa pesquisa, vários sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas das amostras de alfaces e agrião cultivados pelos sistemas orgânico e hidropônico foram avaliadas para se determinar a ação antibacteriana dos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre. Nas tabelas 5, 6, 7 e 8 são apresentadas as características numéricas obtidas a partir dos antibiogramas realizados com os óleos essenciais frente às *E. coli* enteropatogênicas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, as *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) isoladas das alfaces orgânicas e hidropônicas demonstraram sensibilidade (+) frente a ação do óleo essencial do manjeriço, uma vez que, a média dos halos de inibição variou de 11,22mm a 11,43mm e de 11,0mm a 12,0mm, respectivamente (Apêndice D e E). Não se constatou diferenças significativas ($p > 0,05$) nas médias dos halos de inibição entre os diferentes sorogrupos de *E. coli* EPEC sensíveis ao óleo essencial do manjeriço (Tabela 5).

Em virtude dos sorogrupos O26, O126 (EPEC) e O157 (EHEC) terem sido isolados somente das amostras de alface orgânica, os resultados referentes atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente a esses sorogrupos não foram submetidas a tratamentos estatísticos; no entanto, esses sorogrupos foram sensíveis (+) a ação do óleo essencial com halo de inibição (médias) de 11,13mm, 11,10mm e 11,57mm, respectivamente (Apêndice E). Os referidos sorogrupos foram sensíveis também frente à ação do óleo essencial do gengibre, no entanto, apresentaram médias de halos de inibição inferiores às obtidas com o óleo do manjeriço, a saber, 10,0mm para o sorogrupo O26, 10,2mm para o O126 e 10,0mm para O157 (Apêndice F).

Os sorogrupos de *E. coli* EPEC isolados do agrião orgânico e hidropônico também foram sensíveis a ação do óleo essencial do manjeriço, apresentando médias de halos de inibição variando entre 12,30mm e 12,70mm para os sorogrupos isolados do agrião orgânico e entre 11,20mm e 11,40mm para os isolados do hidropônico (Tabela 7, Apêndice H e I). A análise estatística dos resultados

demonstrou que houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à sensibilidade dos sorogrupos isolados do agrião orgânico e os isolados do agrião hidropônico com relação à ação do óleo essencial do manjeriço.

Tabela 5. Características numéricas da atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente à *Escherichia coli* EPEC isoladas de alfaces cultivadas pelos sistemas orgânico e hidropônico segundo sorogrupos e tamanho do halo de inibição (mm).

Sorogrupos	Alface Orgânica					Alface Hidropônica				
	Tamanho da amostra	Média Aritmética (Halo/mm)	Intervalo de Confiança 95%	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)	Tamanho da amostra	Média Aritmética (Halo/mm)	Intervalo de Confiança 95%	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
055	29	11.24 a	11.08 a 11,41	0.4355	3.87	30	11.67 a	11.49 a 11,85	0.4795	4.11
0111	5	11.40 a	10.72 a 11,09	0.5477	4.80	15	11.00 a	-	0.00	0.00
0114	10	11.60 a	11.23 a 11,97	0.5163	4.45	10	11.50 a	11.12 a 11.88	0.5271	4.58
0125	9	11.22 a	10.88 a 11,56	0.4410	3.93	10	11.90 a	11.67 a 12,13	0.3162	2.66
0127	5	11.40 a	10.72 a 12.08	0.5477	4.80	5	11.00 a	-	0.00	0.00
0142	7	11.43 a	10.93 a 11,92	0.5345	4.68	10	12.00 a	-	0.00	0.00

Nota: Médias seguidas com mesma letra minúscula, na mesma linha, não diferem significativamente entre si a 95% de probabilidade pelo teste t de Student ($p < 0.05$).

Tabela 6. Características numéricas das atividades antibacterianas do óleo essencial do gengibre frente à *Escherichia coli* EPEC isoladas de alfaces cultivadas pelos sistemas orgânico e hidropônico segundo sorogrupos e tamanho do halo de inibição (mm).

Sorogrupos	Alface Orgânica					Alface Hidropônica				
	Tamanho da amostra	Média Aritmética (Halo/mm)	Intervalo de Confiança 95%	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)	Tamanho da amostra	Média Aritmética (Halo/mm)	Intervalo de Confiança 95%	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
055	29	10.10 a	9.99 a 10.22	0.3099	3.07	30	10.30 a	10.13 a 10.47	0.4661	4.53
0111	5	10.20 a	9.64 a 10.76	0.4472	4.38	15	10.13 a	9.94 a 10.33	0.3519	3.47
0114	10	10.50 a	10.12 a 10.88	0.5271	5.02	10	10.00 a	-	0.00	0.00
0125	9	10.00 a	-	0.00	0.00	10	10.00 a	-	0.00	0.00
0127	5	10.00 a	-	0.00	0.00	5	10.00 a	-	0.00	0.00
0142	7	10.00 a	-	0.00	0.00	10	10.20 a	9.90 a 10.50	0.42	4.13

Nota: Médias seguidas com mesma letra minúscula, na mesma linha, não diferem significativamente entre si a 95% de probabilidade pelo teste t de Student ($p < 0.05$).

Tabela 7. Características numéricas da atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente à *Escherichia coli* EPEC isoladas do agrião cultivado pelos sistemas orgânico e hidropônico segundo sorogrupos e tamanho do halo de inibição (mm).

Sorogrupos	Agrião Orgânico					Agrião Hidropônico				
	Tamanho da amostra	Média Aritmética (Halo/mm)	Intervalo de Confiança 95%	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)	Tamanho da amostra	Média Aritmética (Halo/mm)	Intervalo de Confiança 95%	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
055	10	12.70 b	12.11 a 13.29	0.8233	6.48	20	11.25 c	11.04 a 11.46	0.4443	3.95
0125	20	12.50 b	12.14 a 12.87	0.7609	6.09	5	11.40 c	10.72 a 12.08	0.5477	4.80
0126	8	12.50 b	11.87 a 13,13	0.7559	6.05	29	11.28 c	11.10 a 11.45	0.4549	4.03
0127	10	12.30 b	11.62 a 12.98	0.9487	7.71	5	11.20 c	10.64 a 11.76	0.4472	3.99

Nota: Médias seguidas com mesma letra minúscula, na mesma linha, não diferem significativamente entre si a 95% de probabilidade pelo teste t de Student ($p < 0.05$).

Tabela 8. Características numéricas das atividades antibacterianas do óleo essencial do gengibre frente à *Escherichia coli* EPEC isoladas do agrião cultivado pelos sistemas orgânico e hidropônico segundo sorogrupos e tamanho do halo de inibição (mm).

Sorogrupos	Agrião Orgânico					Agrião Hidropônico				
	Tamanho da amostra	Média Aritmética (Halo/mm)	Intervalo de Confiança 95%	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Tamanho da amostra	Média Aritmética (Halo/mm)	Intervalo de Confiança 95%	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
055	10	10.30 a	9.95 a 10.55	0.4831	4.69	20	9.55 a	9.31 a 9.79	0.5104	5.34
0125	20	10.05 a	9.95 a 10,16	0.2236	2.22	5	9.80 a	9.24 a 10,36	0.4472	4.56
0126	8	10.38 a	9.44 a 10,81	0.5176	4.99	18	9.67 a	9.41 a 9.91	0.4851	5.02
0127	10	10.10 a	9.87 a 10,33	0.3162	3.13	5	9.00 a	-	0,00	0.00

Nota: Médias seguidas com mesma letra minúscula, na mesma linha, não diferem significativamente entre si a 95% de probabilidade pelo teste t de Student ($p < 0.05$).

A atividade antibacteriana apresentada pelo óleo essencial do manjeriço frente a *E. coli* EPEC observada nesta pesquisa esta de acordo com os resultados encontrados por Duarte et al., (2006) que ao pesquisarem o efeito de óleos essenciais de plantas medicinais usadas no Brasil, incluindo o manjeriço, frente *Escherichia coli* EPEC e ETEC consideraram a atividade antibacteriana do óleo como sendo moderada. Moreira et al., (2005) ao analisarem os parâmetros inibitórios de óleos essenciais para reduzir a ação de patógenos de origem alimentar, verificaram que dentre os óleos testados, o manjeriço apresentou um halo de inibição de 11mm frente a *E. coli*. Hussain et al., (2008) relataram sobre a ação do óleo essencial do manjeriço frente a diferentes microrganismos. Dentre as bactérias testadas frente à ação do óleo, a *Escherichia coli* demonstrou sensibilidade ao apresentar um halo de inibição de 11,4mm, resultados compatíveis aos encontrados nesta pesquisa.

Suppakul et al., (2003) comentaram sobre a atividade antibacteriana do óleo do manjeriço frente a uma grande variedade de bactérias Gram negativas e Gram positivas, bolores e leveduras. Segundo esses autores, o óleo essencial extraído por hidrodestilação na Austrália foi avaliado pelo Método de Difusão em Disco no que diz respeito a sua atividade antimicrobiana. Eles constataram que, o óleo essencial de manjeriço demonstrou atividade antimicrobiana frente a 20 dos 24 microrganismos testados, incluindo: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Mucor piriformes*, *Penicillium candidum*, dentre outros. Aboul Ela et al., (1998) e Elgayyar et al., (2001) demonstraram a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial do manjeriço contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Aspergillus niger*.

Sinha e Gulati (1990) ao avaliarem a atividade antibacteriana e antifúngica de alguns óleos essenciais e alguns de seus constituintes, observaram que o óleo essencial do manjeriço apresentou ação inibitória contra a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi*, *Shigella boydii* e *Proteus vulgaris*. Esses autores atribuíram o efeito inibitório a presença dos constituintes majoritários do óleo, o metil chavicol e o linalol. Baratta et al., (1998) comentaram que o manjeriço tipo metil chavicol apresentou atividade antibacteriana frente a diferentes microrganismos, incluindo a *E. coli*.

Hussain et al., (2008) realizaram uma pesquisa para avaliar a ação antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial do manjeriço cultivado no Paquistão e a atividade antibacteriana linalol. De acordo com esses autores tanto o óleo do manjeriço quanto o linalol apresentaram forte ação antimicrobiana frente às bactérias e os fungos testados. Segundo Koutsoudaki, Krsek, Rodger (2005) e Sokovic e Van Griensven (2006) a atividade antimicrobiana do óleo essencial do manjeriço pode ser, em parte, devido à presença do linalol e de outros compostos oxigenados. Bozin et al., (2006) caracterizando a composição dos constituintes voláteis dos óleos essenciais de algumas espécies da família *Lamiaceae*, bem como a sua atividade antimicrobiana, verificaram um halo de inibição de 11mm de diâmetro para o do manjeriço frente a *E. coli* multirresistentes a antibióticos comerciais.

Lachowicz et al., (1998) testaram a atividade antimicrobiana de cinco óleos essenciais de cinco variedades diferentes tipos de manjeriço frente a uma variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas, bolores e leveduras. Esses autores observaram que todos os óleos exibiram atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli*.

Gill et al., (2002) e Mourey e Canillac (2002) relataram que os óleos essenciais, enquanto completos, possui atividade antimicrobiana superior àquela resultante da combinação de componentes majoritários, sugerindo que, os componentes de menor abundância no óleo podem ser críticos para a sua atividade biológica podendo ter um efeito sinérgico potencializando a sua ação. Khanna et al., (1991) e Vasudaran, Kashyap e Sharma (1999) comentaram que componentes menos bioativos ou até mesmo inativos de um óleo essencial podem contribuir para o aumento da sua atividade por influenciar na disponibilidade ou na velocidade de reação.

Os componentes minoritários presentes nos óleos essenciais, de acordo com dados da literatura, desempenham um papel relevante no que se refere à atividade antibacteriana, possivelmente por produzirem um efeito sinérgico entre os outros componentes, como por exemplo, as pesquisas realizadas por Marino, Bersani e Comi (2001) com o óleo essencial de espécies de plantas pertencentes à família *Lamiaceae*, Lattaoui e Tantaoui-Elaraki (1994) e Marino, Bersani e Comi (1999) para certas espécies de tomilho e por Paster et al., (1995) para o orégano.

Dorman e Deans (2000) comentaram que a ação dos óleos essenciais pode está relacionada à sua respectiva composição, a configuração e a estrutura dos componentes constituintes do óleo, ao grupo funcional e a possíveis interações sinérgicas entre os componentes. Bakkali et al., (2008) relataram que, com relação as propriedades biológicas dos óleos essenciais, incluindo a atividade antimicrobiana, é preciso que se tenha em mente que, os óleos essenciais são misturas complexas de numerosas moléculas e que a força de seus efeitos biológicos são resultado do sinergismo entre todas as moléculas.

A literatura relata que, na maioria dos casos, somente os constituintes majoritários de certos óleos essenciais tais como, o terpineol, eugenol, timol, cavacrol, carvone, geraniol, linalol, citronelol, nerol, 1,8-cineol, limoneno, cinemaldeído, entre outros, são avaliados. Geralmente, os componentes majoritários são considerados como o reflexo total dos aspectos biológicos do óleo essencial a partir do qual ele foi isolado e a amplitude dos seus efeitos depende somente de sua concentração quando são testados sozinhos ou incluídos nos óleos essenciais. Contudo, é possível que a atividade dos constituintes majoritários seja modulada por outros compostos presentes em menor quantidade no óleo (FRANZIOS et al., 1997; IPEK et al., 2005; HOET et al., 2006).

Vários óleos essenciais são conhecidos por possuírem propriedades antimicrobianas e em muitos casos esta atividade é devido à presença de constituintes monoterpênicos ativos (COX et al., 2000). Sikkema, De Bont, Poolman (1995) comentaram que os monoterpenos podem exercer efeito danoso a membrana celular.

Mazzanti, Battinelli e Salvatore (1998) ao avaliarem as propriedades antimicrobianas do óleo essencial de espécies da família *Lamiaceae*, verificaram que dentre os compostos identificados como constituintes dos óleos essenciais testados, alguns foram relatados como tendo atividade antimicrobiana, incluindo o 1,8-cineol, limoneno e linalol, monoterpenos comuns no óleo essencial de espécies pertencentes a essa família. Sendo assim, acredita-se que, a atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço observada nessa pesquisa, seja atribuída a um provável sinergismo existente entre os constituintes majoritários do óleo (metil chavicol e o linalol) e os demais constituintes, tais como o α -farnesano, 1,8 cineol e o cadinol, os quais podem potencializar a sua ação antibacteriana.

Em relação à atividade antibacteriana do óleo essencial do gengibre frente aos sorogrupos isolados das alfaces, constatou-se que o mesmo apresentou ação inibitória com uma média de halos de inibição variando entre 10,0mm e 10,50mm e entre 10,0mm e 10,30mm para os sorogrupos isolados das alfaces orgânicas e hidropônicas, respectivamente (Tabela 6, Apêndice E e F). Os resultados da análise estatística evidenciaram que não houve diferenças significativas ($p > 0.05$) entre as médias dos halos de inibição. A média dos halos de sensibilidade apresentada pelos sorogrupos isolados do agrião orgânico variou de 10,05mm a 10,38mm e de 9,0mm a 9,80mm para o agrião hidropônico (Tabela 8, Apêndice J e L). Os sorogrupos de *E. coli* testados não diferiram significativamente ($p > 0,05$) frente à ação do óleo de gengibre apresentando similaridade de sensibilidade.

Segundo Andrade (2009) o gengibre possui forte propriedade bactericida e levemente fungicida. Esse autor afirma têm demonstrado em pesquisas que constituintes ativos dessa planta inibem a reprodução de colônias bacterianas que se alimentam de carboidratos não digeridos. O gengibre reduz o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., mas estimula o crescimento de *Lactobacillus* sp. Ele também é efetivo contra numerosos parasitas nutricionais, tais como *Schistosoma* e *Aniosakis*.

Segundo Martins et al., (2001) compostos como o zingibereno, bisaboleno, curcumeno, neral e geranial, identificados em amostras de óleo essencial extraído do gengibre cultivado em São Tomé e Príncipe possuem atividades antimicrobianas frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas, leveduras e fungos filamentosos.

Srinivasan et al., (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana de 50 plantas medicinais, incluindo o gengibre, frente a 14 espécies de bactérias, dentre as quais a *Escherichia coli*. Os resultados evidenciaram que o gengibre foi uma das plantas que mostrou maior atividade contra as bactérias patogênicas testadas. Nascimento (2004) também constatou a atividade antibacteriana do óleo essencial obtido a partir dos rizomas do gengibre frente a varias bactérias patogênicas, incluindo a *Escherichia coli*, o que pode abrir um leque de oportunidades para novos estudos com esse óleo. Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (1998) pesquisaram as propriedades antimicrobianas de 21 óleos essenciais frente a cinco bactérias patogênicas de origem alimentar. O óleo do gengibre, nesta pesquisa não

apresentou atividade antibacteriana significativa para a *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* e *Campylobacter jejuni*. Hammer, Carson e Riley (1999) ao utilizarem diversos óleos essenciais e extratos de planta contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e leveduras constataram que, a atividade antibacteriana do óleo de gengibre foi comprovada somente contra o *Staphylococcus aureus*.

Os óleos essenciais durante muito tempo serviram como agentes flavorizantes em alimentos e bebidas devido à sua versatilidade e conteúdo de compostos antimicrobianos, possuindo potencial como agentes naturais para a conservação dos alimentos (HELANDER et al., 1998). A atividade antimicrobiana de óleos essenciais é atribuída a um número de pequenas terpenóides e compostos fenólicos, os quais apresentam atividade antibacteriana e/ou antifúngica (JUVEN et al., 1994; SMID, KOEKEN, GORRIS, 1996).

Os efeitos tóxicos sobre a estrutura e função da membrana celular têm sido geralmente usados para explicar a ação antibacteriana de óleos essenciais e seus componentes monoterpênicos. Na verdade, em virtude do seu caráter lipofílico, os monoterpênicos, serão preferencialmente separados da fase aquosa dentro da estrutura da membrana. Como resultado, ocorrerá à expansão da membrana com aumento da fluidez e permeabilidade, alteração de proteínas imersas na membrana e do processo de transporte de íons para o interior da célula, bem como, inibição da respiração (SIKKEMA, DE BONT, POOLMAN, 1994; 1995). Devido a sua inerente lipofilidade, compostos terpenóides demonstram uma afinidade para partição dentro das membranas celulares, onde seu acúmulo pode impactar substancialmente na estrutura e nas propriedades funcionais dessas membranas (SIKKEMA, BONT, POOLMAN, 1995).

Brehm-Stecher e Johnson (2003) descreveram a sensibilidade de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* a antibióticos e aos sesquiterpenóides nerolidol, farnesol, bisabolol e aripitone. Os dois primeiros compostos foram isolados do óleo essencial de gengibre por CG/EM. Os resultados encontrados por estes autores indicaram que os sesquiterpenóides testados apresentaram significativa atividade antibacteriana, pois os mesmos têm a capacidade de provocar alterações na função de barreira da membrana celular de bactérias, permitindo a permeação dentro da célula de solutos exógenos tais como brometo de etídio e antibióticos. Este efeito é mais pronunciado para bactérias Gram positivas, provavelmente devido

à ausência de barreiras adicionais à permeabilidade, particularmente a membrana externa das bactérias Gram negativas.

Alguns autores, levando em consideração a característica lipofílica dos óleos essenciais e as diferenças na membrana celular das bactérias Gram positivas e Gram negativas, concluíram que, os óleos essenciais são mais efetivos contra as bactérias Gram positivas do que contra as Gram negativas (LEMOS et al., 1990; NICAIDO, 1994). Realmente, a membrana externa das bactérias gram negativas, por possuir uma camada fosfolipídica mais fina, torna sua superfície altamente hidrofílica (SMITH-PALMER, STEWART, FYFE, 1998) enquanto que, a presença de uma bi-camada fosfolipídica na membrana celular das bactérias Gram positivas, possibilita a passagem com maior facilidade de compostos hidrofóbicos (ULTEE, KETS, SMID, 1999; COX et al., 2000). Isto pode explicar a baixa sensibilidade das *E. coli* enteropatogênicas (Gram negativas) avaliadas nesta pesquisa aos efeitos citotóxicos do óleo essencial do gengibre. Segundo Bagamboula, Uyttendaele e Debevere (2004) uma possível explicação para a atividade geralmente reduzida dos óleos essenciais frente às bactérias gram negativas pode ser atribuída à dificuldade que os compostos fenólicos lipofílicos possuem para difundir-se em toda a membrana externa.

Cristani et al., (2007) comentaram que a interação membrana-composto é um fenômeno dinâmico, bilateralmente controlado não só pela estrutura do componente químico mas também pela organização da membrana, a qual pode ser afetada pela internalização e absorção do composto na interface membrana-água e, por sua vez, podem ser modificadas como consequência da incorporação desses compostos na estrutura da membrana.

A resistência ou sensibilidade das bactérias a ação antibacteriana dos óleos essenciais varia dependendo dos componentes do óleo. Cada bactéria responde diferentemente aos vários constituintes dos óleos essenciais. Assim, os óleos podem exibir diferentes modos de ação contra diferentes espécies bacterianas podendo agir na bi-camada fosfolipídica da membrana celular, prejudicar uma variedade de sistemas enzimáticos ou destruir e/ou inativar material genético (KIM, MARSHALL, WEI, 1995; COWAN, 1999; FRIEDMAN, 2006).

A resistência microbiana a drogas usadas no combate de patógenos de humanos e animais constitui um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O consumo indiscriminado de antibióticos em alguns

países tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de Saúde Pública.

A busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo as plantas medicinais, tem ganho importância no meio científico. O uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde, especialmente na Ásia, América Latina e África (SHALE, STIRK, VAN STADEN 1999). Em virtude das plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, programas de triagem são necessários para que possa descobrir compostos com atividade biológica para o desenvolvimento de novos medicamentos (AHMAD, BEG, 2001).

De acordo com Sacchetti et al., (2005) e Oussalah (2006) o uso de óleos essenciais em alimentos vem ganhando importância por apresentarem componentes naturais evitando-se o uso de aditivos sintéticos, deteriorações, oxidações e o ataque de microrganismos apresentando eficiência nas funções antioxidantes, antirradicais e antimicrobianas em alimentos.

Alguns pesquisadores têm demonstrado êxito com relação à aplicação dos óleos essenciais e seus componentes, sozinhos ou em combinação com outros métodos de conservação, com o objetivo de reduzir ou controlar a presença de patógenos de origem alimentar e microrganismos deteriorantes de produtos alimentícios, tais como frutas (MASSILIA, MELGAR, BELLOSO, 2006; MARTÍNEZ-ROMERO et al., 2007), peixe (MAHMOUND et al., 2006), carnes (MYTLE et al., 2006) ou leite (CAVA et al., 2007).

Portanto, a pesquisa de novas substâncias com atividade antibacteriana, como no caso dos óleos essenciais extraídos do manjeriço e do gengibre, os quais apresentaram ação antibacteriana frente a diferentes sorogrupos de *Escherichia coli* reconhecidamente patogênicos isolados de alfaces e de agriões orgânicos e hidropônicos, vem contribuir com dados de relevância no que se refere à posterior utilização desses óleos na formulação de novos medicamentos a serem usados no combate das toxinfecções causadas por essa bactéria, podendo ainda desempenhar um importante papel na sanitização e conservação de diferentes alimentos oferecendo uma alternativa natural para o combate e inibição de diferentes microrganismos patogênicos.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nessa pesquisa concluiu-se que:

➤ Independentemente do sistema de cultivo (orgânico ou hidropônico), todas as amostras de hortaliças analisadas apresentaram contaminação por sorogrupos de *E. coli* enteropatogênicas;

➤ Os maiores índices de contaminação por *E. coli* enteropatogênicas foram encontrados nas alfaces e nos agriões orgânicos, atribuídos à utilização de esterco e água contaminada;

➤ Os percentuais de contaminação observados nas alfaces e nos agriões hidropônicos são considerados inaceitáveis, visto que a princípio, este cultivo é realizado em sistemas protegidos de fatores externos;

➤ A presença do sorogrupo *E. coli* O157 (EHEC) nas amostras de alfaces orgânicas é um dado preocupante uma vez que esse sorogrupo é produtor de toxina Shiga e está comumente associado a surtos de diarreias e a síndrome urêmica hemolítica;

➤ As *E. coli* enteropatogênicas isoladas das alfaces e dos agriões orgânicos comercializados em feiras livres na cidade de São Luís/MA, por apresentarem produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), uma característica atípica a essa espécie, foram consideradas mutantes, um dado de grande relevância uma vez que, as espécies pertencentes ao gênero *Escherichia* são H₂S negativas;

➤ Os valores obtidos para as análises físico-químicas dos óleos essenciais evidenciaram a pureza dos mesmos, no entanto, os rendimentos obtidos foram baixos;

➤ A ação antibacteriana apresentada pelos óleos essenciais do manjeriço e do gengibre frente aos sorogrupos de *E. coli* EPEC testados foi atribuída a presença dos seus componentes majoritários, o metil chavicol e o linalol presentes no óleo do manjeriço e do zingibereno no óleo do gengibre. O óleo essencial do manjeriço apresentou maior atividade antibacteriana em relação ao do gengibre;

➤ A atividade antibacteriana dos óleos testados neste trabalho abre novas perspectivas no tocante ao desenvolvimento de fitoterápicos eficazes de baixo

custo para o tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos multirresistentes, podendo também ser usado como uma alternativa natural na conservação de alimentos em substituição aos conservantes químicos. Porém, o potencial uso desses óleos com fins terapêuticos, bem como, na conservação de alimentos necessita de avaliação *in vivo* e de novas pesquisas excluindo os possíveis efeitos indesejáveis no alimento.

7 REFERÊNCIAS

ABOUL ELA, M.A.; EL-SHAER, N.S.; GHANEM, N. B. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. **Pharmazie**, v. 51, p. 993-994, 1998.

ACOSTA, M.; GONZÁLEZ, M.; ARAQUE, M.; VELAZCO, E.; KHOURI, N.; ROJAS, L.; USUBILLAGA, A. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *Ocimum basilicum* L. var *purpurenscens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. **Revista de la Facultad de Farmacia**. v.45, n. 1, p. 19-24, 2003.

ADAM, T.; ARPIN, M.; PREVOST, M.C.; GOUNON, P.; SANSONETTI, P.J. Cytoeskeletal rearrangements and functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. **Journal of Cell Biology**, v. 129, p. 367-381, 1995.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois: Allured, 1995. 469p.

AFZAL, M.; AL-HADIDI, D.; MENON, M.; PESEK, J.; DHAMI, M.S.I.; Ginger: an ethnomedical chemical and pharmacological review. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 18, n. 3-4, p. 160-190, 2001.

AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.113-123, 2001.

ALBUQUERQUE, U. **Taxonomia e etnobotânica do gênero *Ocimum* L. (Lamiaceae) no Nordeste do Brasil - referência especial para Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PB, 1996, 106p.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. El género *Ocimum* L. (Lamiaceae) em el Nordeste del Brasil. **Anales Jardín Botánico de Madrid**, v.56, n. 1, p. 43-64, 1998.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 343-353, 2002.

ALVES, T.M.A.; SILVA A.F.; BRANDÃO M.; GRANDI T.S.M.; SMÂNIA E.F.; SMÂNIA Jr. A.; ZANI C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

AMÂNCIO, G. C. S.; PEREIRA, M. L.; CARVALHO, E. P. *Escherichia coli* enterohemorrágica (*E. coli* O157:H7). 1- Algumas considerações epidemiológicas sobre ecossistema, patogênese e controle. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 37, n. 2, p. 65-73, jul.-dez., 2003.

ANDRADE, C.C. **Gengibre**. Disponível em: <<http://www.plantasmedicinales.org/trabrep/dic2003/jengibre.htm>>. Acesso em 27 mar. 2009.

ANDREOLI, S. P.; TRACHTMAN, H.; ACHESON, D. W.; SIEGLER, R. L.; OGRIG, T. G. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology and therapy. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 17, n. 4, p. 293-298, Apr. 2002.

ANDREWS, G.P.; HROMOCKYI, A.E.; COKER, C.; MAURELLI, A.T. Two novel virulence loci, *mxIA* e *mxIB*, in *Shigella flexneri* 2a facilitate excretion of invasive plasmid antigens. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 6, p. 1997-2005, 1991.

ANGERS, P.; MORALES, M.R.; SIMON, J. Fatty acid variation in seed oil among *Ocimum* species. **JAOCs- Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 3, p.393-395, 1996.

ANSARI, S.H.; ALI, M.; SIDDIQUI, A.A. Evaluation of chemical constituents and trade potential of *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **Hamdard Medicus**. v. 39, n. 1, p.55-59, 1996.

AOAC. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. Washington, 1980.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological of foods**. 4th ed. Washington, 2001.

AVERY, S.M.; MOORE, A.; HUTCHISON, M.L. Fate of *Escherichia coli* originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. **Letters in applied Microbiology**, v.38, n. 5, p.355-359, 2004.

BAGAMBOULA, C.F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, v. 21, p. 33–42, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BALIONI, G.A.; FERNANDES, F.V.; SOARES, M.M.S.R; RIBEIRO, M.C. Avaliação higiênico-sanitária de alfaces agro-ecológicas e cultivadas com agrotóxicos, comercializadas na região de Campinas – SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 112, p.73-78, 2003.

BANATVALA, N.; GRIFFIN, P. M.; BARRETT. T. J.; GREENE, K. D.; BIBB, W. F.; GREEN, J. H.; WELLS, J. G. The United States National prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical and epidemiologic findings. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 183, n. 7, p. 1063-1070, mar. 2001.

BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance. **Trends in Ecology & Evolution**, v.12, n. 12, p. 482-487, 1997.

BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.A.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.A.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p.235-244, 1998.

BARTLEY, J. F.; JACOBS, A. L. Effects of drying on flavor compounds in Australian grown ginger (*Zingiber officinale*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 2, p. 209-215, 2000.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. Philadelphia, v.45, p.493-496, 1966.

BAUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; HEFFRON, F. The Ipf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches **Proceedings of the Natural Academy of Science**, v. 93, p. 279-283, 1996.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **E. coli: una aproximación practica al microorganismo y su control em los alimentos**. 1ª ed. Editorial Acribia: Zaragoza, Espanha, 1998. 229p.

BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesion mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strains 2787 (O126:H27). **Infection and Immunity**, v. 60, n. 1, p. 13-18, 1992.

BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 21, n. 2, p. 197-201, mai./ago. 2001.

BERNET-CAMARD, M.F.; COCONNIER, S.; HUDAULT, S.; SERVIN, A.L. Differential expression of complement proteins and regulatory decay accelerating factor in relation to differentiation of cultured human colon adenocarcinoma cells lines. **Gut – International Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 548-553, 1996.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; BOUGUÉNEC, C.L. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detection the AAF-encoding operon family. **Infection and Immunity**, v.70, n. 8, p. 4302-4311, 2002.

BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 81-92, jul./dez. 2007.

BEUCHAT, L. R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. **Journal Food Protection**, v. 62, p. 845-849, 1999.

BEUTIN, L.; GLEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2483-2488, 1993.

BHATTARAI, S.; TRAN, V.H.; DUKE, C.C. The stability of gingerol and shogaol in aqueous solutions. **The European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 10, p. 1658–1664, 2001.

BIEBER, D.; RAMER, S.W.; WU, C.Y.; MURRAY, W.J.; TOBE, T.; FERNANDEZ, R.; SCHOOLNIK, G. K. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 280, n. 537, p. 2114-2118, 1998.

BILGE, S.S.; CLUSEN, C.; LAW, W.; MOSELEY, S.L. Molecular characterization of a fimbrial adhesion, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Journal Bacteriology**, v.171, n. 8, p. 4281-4289, 1989.

BIOMÉRIEUX. ***Salmonella, Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae in foods: biochemical system identification (API-20)**. Hazelwood, 1997.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; RAMOS, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **Amer. J. Vet. Res.**, v. 54, p. 1446-1451, 1994.

BLANK, A.F.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; SANTOS NETO, A.L.; ALVES, P.B.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA MANN, R.; MENDONÇA, M.C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. **Revista de Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 113-116, 2004.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMAANN, J. **Herbal medicine**, 1^a Ed., Integrative Medicine Communications, p. 404-407, 2000.

BOPP, C.A; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N.A. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PAFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual Clinical Microbiology**. Washington D.C: ASM, 1999, p. 459-466.

BOZIN, B.; DUKIC, N.M.; SIMIN, N.; ANACKOV, G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, 2006.

BRACKETT, R. E. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. **Postharvest Biology and Technology**, Georgia, v.15, n. 3, p. 305-311, 1999.

BRACKETT, R. E.; SPLITTSTOESSER, D. F. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 10, p. 804-814, 1992.

BRANDL, M. T. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 367-392, 2006.

BRASIL. Centro de Vigilância Epidemiológica/CVE/SESSP. **Manual das doenças transmitidas por alimentos**, 2001. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/ecolinet.htm>>. Acesso em: 20/10/2008.

BREHM-STECHER, B.; JOHNSON, E.A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol and apritone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3357-3360, 2003.

BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C.; PIFFER, I. A. Caracterização da virulência da cepa de *Escherichia coli* - BK99. **Revista Ciência Rural**, v.31, n.3, p.455-459, 2001.

BRITO, B. G.; VIDOTTO, M. C.; BERBEL, M. M.; TAGLIARI, K. C. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. **Revista Ciência Rural**, v.34, n.2, p. 645-652, 2004.

BRUNETON, J. **Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales**. 2^a ed. Zaragoza (Espanha): Editota Acribia, 2001.

BUCHANAN, R. L.; DOYLE, M.P. Foodborne disease significance *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Food Technology**, v. 51, n. 10, p. 69-71, 1997.

BUFFON, M. C. M.; LIMA, M. L. C.; LIMA, V. C. N.; GALARDA, I. ; CARVALHO, J. L. S.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Estudo do efeito do extrato de *Nasturtium officinale*, R. BR. no controle do crescimento de microrganismos presentes na cavidade bucal e placa dentária *in vitro*. **Visão Acadêmica**, v.6, n.1, p.33-41, 2005.

BURKS, G.; LOGAN, B. E. Direct measurement of bacterial adhesion to solid surfaces using bacteria with varying outer layer surface composition. In: LOGAN, B. E.; HATCHER, P. G.; GRAY, K. **Analysis of environmental phenomena at molecular scales**. Preprints of Extended Abstracts. Chicago: American Chemical Society, v. 41, n. 2, p. 271-275, 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n. 3, p.223-253, 2004.

CAETANO, L.C.S.; FERREIRA, J.M.; ARAUJO, M.L. DE; SILVA, V.V.; LEAL, M.A. DE A.; ANDRADE, W.E. B. **A cultura da alface: perspectivas, tecnologias e viabilidade**. Niteroi: Varela, 2001, 23p.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, 2004.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 6, p. 545-552, oct. 2004.

CAMPOS, L.C.; WHITTAM, T.S.; GOMES, T.A.T.; ANDRADE, J.R.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 3.282-3.288, 1994.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

CARVALHO FILHO, J.L.S.; BLANK, A.F.; EHLERT, P.A.D.; ALVES, P.B.; MELO, A.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R.S. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 1, p. 24-30, 2006.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo de plantas medicinais: metabolitos secundários**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2001, p. 104.

CAVA, R.; NOWAK, E.; TABOADA, A.; MARTIN-INIESTA, F. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 2, p. 2757-2763, 2007.

CEBALLOS, B. S. O.; KONIG, A.; OLIVEIRA, J. F. Dam reservoir eutrophication. A. Simplified technique for a diagnosis of environmental degradation. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 34, n.11, p.3477-3483, 1998.

CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2007.

CHALCHAT, J.C.; ÖZCAN, M.M. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 501-503, 2008.

CHARLES, D.G.; SIMON, J.E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil (*Ocimum* spp.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 15, n. 3, p. 458-462, 1990.

CHIANG, L.C.; CHENG, P.W.; CHIANG, W.; LIN, C.C. Antiviral activity of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, n. 10, p. 811-816, 2005.

CHITARRA, M.I.F. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 1998, 88p.

CHRUBASIK, S.; PITTLER, M.H.; ROUFOGALIS, B.D. Zingiberis rhizome: A comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. **Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**, v. 12, p. 684-701, 2005.

CLARKE, S.C. Diarrheagenic *Escherichia coli* – an emerging problem. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**. v. 41, n. 3, p. 93-98, 2001.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard. 10^a Ed., v. 29, n. 1, p. 1-53, January, 2009.

COELHO, T. **Herbário Virtual**. Disponível em: <http://plantasmilagrosas.blogspot.com/2009/10/manjericao-ervas-medicinais-o.html>. Acesso em 28/10/2009.

CORRÊA JUNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2^a. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 151p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. v. 1, 5^a ed., Lisboa: Fundação Caloutre Gulbenkian, p. 1030, 1994.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582. 1999.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R. The mode of antimicrobial action of the essential oil from *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal Applied Bacteriology**, v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, 2007.

CRUZ, A. R. M. S.; VIEIRA, B. M. C.; SILVA, C. L. M. A. Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*). **Journal of Food Engineering**, v. 72, p.8-15, 2006.

DE MASI, L.; SIVIERO, P.; ESPOSITO, C.; CASTALDO, D.; SIANO, F.; LARATTA, B. Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 2, p. 273-281, 2006.

DEDOV, V.N., TRAN, V.H., DUKE, C.C., CONNOR, M., CHRISTIE, M.J., MANDADI, S., ROUFOGALIS, B. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, n. 6, p. 793-798, 2002.

DEPORTES, I.; BENOIT-GUYOD, J.L.; ZMIROU, D.; BOUVIER, M.C. Microbial disinfection capacity of municipal solid waste (MSW) composting. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, n. 2, p.238-246, 1998.

DINIZ, C. R. **Aspectos sanitários de corpos lênticos temporários utilizados para consumo humano**. 143p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande – PB, 1994.

DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 10, p. 3953-3961, 1992.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DOYLE, P. M.; CLIVER, D. O. *Escherichia coli*. In: CLIVER, D. O. Foodborne Diseases, London: Academy Press, p. 209-215. 1990.

DROFFNER, M. L.; BRINTON, W. F. Survival of *E. coli* and Salmonella populations in aerobic thermophilic compounds as measured with DNA gene probes. **Zentralblatt für Hygiene**, v.197, n. 5, p.387-397, 1995.

DUARTE, M.C.T.; LEME DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against EPEC and ETEC *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. esp., p. 139-143, 2006.

EKLUND, M.; LEINO, K.; SIITONEN, A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles. **Journal Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4585-4593, 2002.

ELENA, S.F.; WHITTAM, T.S.; WINKWORTH, C.L.; RILEY, M.A.; LENSKI, R.E. Genomic divergence of *Escherichia coli* strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates. **International Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 271-278, 2005.

ELGAYYAR, M.; DRAUGHON, F. A.; GOLDEN, D. A.; MOUNT, J. R.; Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1019-1024, 2001.

ELIAS, W. P.; BARROS, S. F.; MOREIRA, C.G.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. T. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains among classical enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroups. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3540–3541, 2002.

ELLIOT, S.J.; WAINWRIGTH, L.; MACDANIEL, T.K.; KAPER, J.B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1-4, 1998.

ELPO, E. R. S. **Cadeia produtiva do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no Estado do Paraná: análise e recomendações para melhoria da qualidade**. 2004. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

EMBRAPA - Hortaliças. Disponível em: www.cnph.embrapa.br. Acesso em 28 de Agosto de 2009.

ESSAWI, T; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, n.3, p.343-349, 2000.

FABROWSKI, F.J. ***Eucaliptus smithii* R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. Curitiba, 2002, 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. The gut at war: the consequence of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. **São Paulo Medical Journal\ Revista Paulista de Medicina**, v. 118, n. 1, p. 21-29, 2000.

FARMACOPEIA BRASILEIRA IV – PARTE 1. 4ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1996, 1.320p.

FERNANDES, A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; PEREIRA, P. R. G.; FONSECA, M. C. M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Revista de Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 195-200, 2002.

FERNANDES, P. C.; FACANALI, R.; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; MARQUES, M. O. M. Cultivo de manjeriço em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. **Revista de Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 22, n. 2, p. 260-264, 2004.

FERREIRA, A.; PROENÇA, C.; SERRALHEIRO, M. L. M.; ARAÚJO, M. E. M. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medical plants from Portugal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1-3, p. 31-37, nov., 2006.

FINLAY, B.B.; RSENSHINE, I.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Cytoesqueletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p. 2541-2543, 1992.

FOOD SAFETY SMART. **An introduction to *E. coli* part 1**. Disponível em: <http://foodsafetysmart.com/2009/03/10/an-introduction-to-e-coli-part-1/>. Acesso em 10 de março de 2009.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANZIOS, G.; MIROTSO, M.; HATZIAPOSTOLON, H.; KRAL, J.; SCORAS, Z.G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2690-2694, 1997.

FRIEDMAN, M. Antibiotic activities of plant compounds against no-resistant and antibiotic-resistant foodborne human pathogens. In: JUNEJA, V.K.; CHERRY, J. P. & TUNICK, M. H. (Eds.), *Advances in Microbial Food Safety*. ACS Symposium Series, pp. 167-183. Washington, DC: **American Chemical Society**, 2006.

GARCIA-VILLANOVA, R. B; GALVEZ, V. R. Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. **Journal Food Microbiology**, v. 4, p. 285-291, 2000.

GIAMMANCO, A.; MAGGIO, M.; GIAMMANCO, G.; MORELI, R.; MINELLI, F.; SCHEUTZ, F.; CAPRIOLI, A. Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea. **Journal Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 689-694, 1996.

GILL, A. O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. A. Evaluation of anti-listerial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 83-92, 2002.

GILLIGAN, P.H. *Escherichia coli*: EAEC, EHEC, EIEC, ETEC. **Clinical Laboratory Medicine**, v.19, n. 3, p. 505-521, 1999.

GIRÓN, J.A.; HO; A.S.; SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 710-713, 1991.

GOMES, T.A.T., VIERIRA, M.A.M., ABE, C.M., RODRIGUES, D., GRIFFIN, P.M., RAMOS, S.R.T.S. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3609-3613, 1998.

GONÇALVES, E.S.; MARQUES, M.H.M.; LUCCA, P.S.R. A segurança alimentar e os consumidores: um breve estudo sobre a *Escherichia coli*. **Revista CESUMAR-Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v. 7, n. 1, p. 7-29, 2002.

GOOSNEY, D.; DEVINNEY, R.; PFUETZNER, R.; FREY, E.; STRYNADKA, N.C.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actin. **Current Biology**, v. 10, n. 12, p. 735-738, 2000.

GOOSNEY, D.L.; CELLI, J.; KENNY, B.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 490-495, 1999.

GRAYER, R.J.; KITE, G.C.; GOLDSTONE, F.J.; BRYAN, S.E.; PATON, A.; PUTIEVSKY, E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1033-1039, 1996.

GREENBERG, D. E.; JIANG, Z. D.; STEFFEN, R.; VERENKER, M. P; DUPONT, H. L. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. **The Journal of Infectious Diseases**, v.185, n. 7, p. 944-949, 2002.

GRÉGIO, A. M. T.; FORTES, E. S. M.; ROSA, E. A. R.; SIMEONI, R. B.; ROSA, R. T. Ação antibacteriana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. **Revista Estudos de Biologia**, v.28, n. 62, p. 61-66, jan./mar. 2006.

GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: BLASER, M.J.; SMITH, P.D.; RAVDIN, J.I.; GREENBERG H.B.; GUERRANT, R.L. (ed). **Infections of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, p. 739-761, 1995.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 60-98, 1991.

GUADAGNIN, S. G.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Evaluation of the nitrate content in leaf vegetables produced through different agricultural systems. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 12, p. 1203-1208, 2005.

GUIMARÃES, A. M.; ALVES, E.G.L.; FIGUEIREDO, H.C.P.; COSTA, G.M.; RODRIGUES, L.S. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 621-3, 2003.

GUTH, B.E.C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; CERQUEIRA, A.M.; CHILLEMI, G.; ANDRADE, J.R.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M. Serotypes and Shiga toxin phenotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and foods in Argentina and Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 335-349, 2003.

GUTH, B.E.C; DE SOUZA, R.L.; VAZ, T.M.; IRINO, K. First Shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 8, n. 5, p. 535-536, 2002.

GUTH, B.E.C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* - an overview. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95 (supl. 1), p. 95-97, 2000.

GYLES, C. L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 734-746, 1992.

HABSAH, M; AMRAN, M; MACKEEN, M.M; LAJIS, N.H; KIKUZAKI, H; NAKATANI, N; RAHMAN, A.A; ALI, A.M. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, n. 3, p.403-410, 2000.

HAMMER, K.A; CARSON, C.F; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts. **Journal of Applied Microbiology**. v. 86, n. 6, p.985-990, 1999.

HARBORNE, J.B. **Ecological biochemistry**. 4 ed. London: Academic, 1993.

HARNETT, N.; MANGAN, L.; BROWN, S.; KRISHNAN, C. Thermosensitive transfer of antimicrobial resistances and citrate utilization and cotransfer of hydrogen sulfide production gram an *Escherichia coli*. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 24, n. 4, p. 173-178, 1996.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M. Characterization of the action of selected oil components on gram-negative bacteria. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 46, n.9, p. 3590-3595, 1998.

HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P. Virulence factors of autotransporter proteins. **Infection and Immunity**, v.69, n. 3, p.1231-1243, 2001.

HENDERSON, I.R.; HICKS, S.; NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W.P.; PHILIPS, A.D.; NATARO, J.P. Involvement of enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin incausin human intestinal damage. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5338-5344, 1999.

HENRIETTE, K. ***Nasturtium officinale***. Disponível em: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p09/pages/nasturtium-officinale-4.htm>. Acesso em 23 mar. 2009.

HEUVELINK, A.E.; VAN HEERWAARDEN, C.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.; VAN OOSTERON, R.; EDINK, K.; VAN DUYNHOVEN, Y.T.; DE BOER, E. *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with a petting zoo. **Epidemiology and Infection**, v. 129, p. 295- 302, 2002.

HICKS, S.; CANDY, D.C.A.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 11, p. 4751-4760, 1996.

HILBORN, E.D.; MERMIN, J.H.; MSHAR, P.A.; HADLER, J.L.; VOETSCH, A.; WOJTKUNSKI, C.; SWARTZ, M.; MSHAR, R. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. **Archives of Internal Medicine**, v. 159, p. 1758-1764, 1999.

HIMATHONGKHAM, S.; BAHARI, S.; RIEMAN, H.; CLIVER, D. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in cow manure and cow manure slurry. **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, n. 2, p. 251-257, 1999.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo, 1998.

HOET, S.; STÉVIGNY, C.; HÉRENT, M. F.; QUETIN-LEELEREQ, J. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta Medica**, v. 72, p. 480-482, 2006.

HOLETZ, F.B; PESSOINI, G.L; SANCHES, N.R; CORTEZ, D.A.G; NAKAMURA, C.V; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.7, p.1027-1031, Oct. 2002.

HOLT, J.; KRIEG, N.R.; SNEATHE, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th Ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1994.
HORTICULTURA. **Diagnóstico**. Disponível em: www.sebrae-ma.gov.br. Acesso em 5 de set. de 2009.

HUANG, D.B.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An emerging pathogen in children. **Journal of Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 266-271, 2004.

HUANG, D.B.; MOHANTY, A.; DUPONT, H. L.; OKHUYSEN, P. C.; CHIANG, T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 10, p.1303-1311, 2006.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S.T.H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.

HUYS, G.; CNOCKAERT, M.; JANDA, J. M.; SWINGS, J. *Escherichia albertii* sp nov, a diarrhoeogenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 807-810, 2003.

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL. **Alface Crespa**. Disponível em: <http://www.informacaonutricional.net/nutricao/alface-crespa-crua-tabela-valor/>. Acesso em 7 de março de 2009.

INGHAM, S.C.; LOSINSKI, J.A.; ANDREWS, M.P.; BREUER, J.E.; BREUER, J.R.; WOOD, T.M.; WRIGHT, T.H. *Escherichia coli* contamination of vegetables grown in soils fertilized with noncomposted bovine manure: garden-scale studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.11, p.6420-6427, 2004.

IPEK, E.; ZEYTIÑOGLU, H.; OKAY, S.; TUYLU, B. A.; KURKEUOGLU, M.; HUSNU, CAN BASER, K. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and cavracol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 551-556, 2005.

IRINO, K.; VAZ, T.M; KATO, M.A.; NAVES, Z.V.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.; ROCHA, M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.; GUTH, B. E. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 446-447, 2002.

ITOH, Y.; SUGITA-KONISHI, Y.; KUSUGA, F.; IWAKI,M.; HARA-KUDO, Y.; SATIO, N. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1532-1535, 1998.

JABLASON, J.; WARRINER, K.; GRIFFITHS, M. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in plants cultivated in a gnotobiotic system. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 7-18, 2005.

JAEGER, J. L.; ACHESON, D. W. Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Current Infectious Diseases Reports**, London, v. 2, n.1, p.61-67, fev. 2000.

JALLAT, C.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; RICH, C.; JOLY, B. Survey of clinical isolates of diarrheogenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. **Research in Microbiology**, v. 145, n. 8, p. 621-632, 1994.

JALLAT, C.; LIVRELLI, V.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; RICH, A.; JOLY, B. *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2031-2037, 1993.

JARVIS, K.G.; GIRÓN, J.A.; JERSE, A.E.; MCDANIELA, T.K.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proceedings of the Natural Academy of Science**, v. 92, n. 17, p. 7996-8000, 1995.

JARVIS, K. G.; KAPER, J. B. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via putative type III secretion system. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 11, p. 4826-4829, 1996.

JENNINGS, W.; MITTFELDELT, E.; STREMPLE, P. **Analytical gas chromatography**. 2 ed., San Diego: Academic, 1997, 389p.

JERKOVIĆ, I.; MASTELIĆ, J.; MILOŠ, M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. spp. *Hirtum* grown wild in Croatia. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 649-654, 2001.

JERSE, A.E.; YU, J.; TALL, B.D.; KAPER, J.B.A. Genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the Natural Academy of Science**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, 1990.

JOHANNESSEN, G.S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 199-204, 2002.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal Applied Bacteriology**, v. 76, n. 6, p. 626-631, 1994.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M.; BITZAN, M.; SCHMIDT, H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 34, n. 3, p. 229-243, 1999.

KASALI, A. A.; ESHILOKUN, A. O.; ADEOLA, S.; WINTERHALTER, P.; KNAPP, H.; BONNLANDER, B.; KOENIG, W. A. Volatile oil composition of new chemotype of *Ocimum basilicum* L. from Nigeria. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 1, p. 45-47, 2004.

KATARZYNA, J. L.; GWYN, P. J.; DAVID, R. B.; FRED, E. B.; MARTIN, V. P.; SIMON, S. T. T.; MURRAY, H. Characteristics of essential oil from basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 877-881, 1996.

KEITA, S.M.; VICENT, C.; SCHMIT, J.; ARNASON, J.T.; BELANGER, A. Efficacy of oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, n. 4, p. 339-49, 2001.

KENNY, B.; DE VINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHEID, D.J.; FREY, E.A.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511-520, 1997.

KENNY, B.; FINLAY, B.B. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals in epithelial cells. **Proceedings of the Natural Academy of Science**, v. 92, n. 17, p. 7991-7995, 1995.

KESKIMAKI, M.; SAARI, M.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: Prevalence and characteristics of isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3641-3646, 1998.

KETOH, K.G.; GLITOH, A.I.; HUIGNARD, J. Susceptibility of the bruchus *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenopterae: Pteromatidae) to three essential oils. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, p. 174-82, 2002.

KHANNA, R.; JOHRI, J.K.; SRIVASTAVA, K.M.; KHANNA, S. Screening for alternative biocides amongst plant-based essential oils. **Natural Academic Science Letters**, v. 14, p. 3-6, 1991.

KHATRI, L.M.; NASIR, M.K.A.; SALEEM, R.; NOOR, F. Evaluation of Pakistani sweet basil oil for commercial exploration. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 38, p. 281-282, 1995.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n.11, p. 2839-2845, 1995.

KNUTTON, S.; SHAW, R.K.; ANANTHA, R. P.; DONNENBERG, M. S.; ZORGANI, A. A. The Type-IV bundle forming-pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 499-509, 1999.

KOBA, K.; POUTOULI, P.W.; RAYNAUD, C.; CHAUMONT, J.P.; SANDA, K. Chemical composition and antimicrobial properties of different basil essential oils chemotypes from Togo. **Journal of the Bangladesh Pharmacological Society**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2009.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

KOUBA, M. Quality of organic animal products. **Livestock Production Science**, França, v.80, n.1/2, p.33-40, 2003.

KOUTSOUDAKI, C.; KRSEK, M.; RODGER, A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7681-7685, 2005.

KUDVA, I.T.; BLANCH, K. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3166-3174, 1998.

KUHNERT, P., BOERLIN, P., FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolated from water, food and environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 107-117, 2000.

LABRA, M.; MIELE, M.; LEDDA, B.; GRASSI, F.; MAZZEI, M.; SALA, F. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Plant Science**, v. 167, p. 725-731, 2004.

LACHOWICZ, K.J.; JONES, G.P.; BRIGGS, D.R.; BIENVENU, F.E.; PALMER, M.V.; TING, S.S.T.; HUNTER, M. Characteristics of essential oil from basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 44, p. 877-881, 1996.

LACHOWICZ, K.J.; JONES, G.P.; BRIGGS, D.R.; BIENVENU, F.E.; WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M.J. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 209-214, 1998.

LAGAGGIO, V. R. A.; FLORES, M. L.; SEGABINAZI, S.D. Avaliação parasitológica da alface (*Lactuca sativa*) consumida *in natura* no restaurante da Universidade Federal de Santa Maria, RS. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 97, p. 62-65, jun. 2002.

LANGNER, E.; GREIFENBERG, S.; GRUENWALD, J. Ginger: history and use. **Advances and Therapy**, v. 15, n. 1, p. 25-44, 1998.

LARNEY, F.J.; YANKE, L.J.; MILLER, J.J.; McALLISTER, T.A. Fate of coliform bacteria in composted beef cattle feedlot manure. **Journal of Environmental Quality**, v.32, n. 4, p.1508-1515, 2003.

LATTAOUI, N.; TANTAOUI-ELARAKI, A. Individual and combined antimicrobial activity of the main components of three thyme essential oils. **Revista Italiana EPPOS**, v. 13, p. 13-19, 1994.

LAU, M.M.; INGHAM, S.C. Survival of faecal indicator bacteria in bovine incorporated into soil. **Letter and Applied Microbiology**, v.33, n. 2, p.131-136, 2001.

LAUTROP, H.; ORAKOV, L.; GAARALEV, K. Hydrogen sulfide producing variants of *Escherichia coli*. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**. v. 79, n. 5, p. 641-650, 1971.

LAWRENCE, B.M. A further examination of the variation of *Ocimum basilicum* L. In: LAWRENCE, B. M.; MOOKERJEE, B.D. & WILLIS, B.J. (Eds.), **Flavors and Fragrances: A world perspective**. Amsterdam: Elsevier Science Public B.V., 1988, pp. 161-170.

LECLERC, J.E.; LI, B.; PAYNE, W.L.; CEBULA, T. A. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. **Science**, v. 274, n .5290, p. 1208-1211, 1996.

LEITÃO, M.F.F. Perigos em Produtos Agrícolas Frescos. In: **Elementos de apoio para as boas práticas agrícolas e o sistema APPCC**. Brasília, DF: Campos PAS, 2004. p. 29-82.

LEMONS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; CLARK, A.M.; McCHESNEY, J.D.; Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, n. 2, p. 82-84, 1990.

LEVINE, M.M., FERRECCIO, C., PRADO, V., CAYAZZOM., ABREGO, P., MARTINEZ, J., MAGGI, L., BALDINI M.M., MANEVAL, D., KAY, B., GUERS, L., LIOR, H., WASSERMAN, S.S., NATARO, J.P. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrhea infection in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. **American Journal Epidemiology**, v. 138, n. 10, p. 849-869, 1993.

LEVINGER, B. School feeding, school reform, and food security: connecting the dots. **Food Nutrition Bulletin**, v.26, p.170-178, 2005.

LEWINSOHN, E.; ZIV-RAZ, I.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; LASTOCHKIN, E.; LARKOV, O.; CHAIMOVITSH, D.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; PICHESKY, E.; SHOHAM, Y. Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.): developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. **Plant Science**, v. 160, p. 27–35, 2001.

LIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. In: GYLES, C.L. **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Wallingford: Cab International, 1994, p. 31-72.

LOGGIA, R. D. **Piante officinali per infuse e tisane**. Organizzazione Editoriale Medico Farmacêutica, 3ª Ed. p. 354, 1993.

LONCAREVIC, S.; JOHANNESSEN, G.S.; RORVIK, L.M. Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 186-189, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 512 p.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbial genetics. in Biology of microorganisms**, 8th Ed., USA: Prentice-Hall, 1996. pp. 304-356.

MAGALHÃES, M. T., KOKETSU, M., GONÇALVES, S.L., CORNEJO, S.L., MARQUES, F.E.P., ROSAMIGLIA, L.M. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina. Parte (2) – secagem, óleo essencial e oleoresina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n. 2, p. 132-136, 1997.

MAHMOUND, A. L. Antifungal action and antitoxigenic properties of some essential oil constituents. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, p.110-113, 1994.

MAHMOUND, B.S.; YAMAZAKI, K.; MIYASHITA, K.; KAWAI, Y.; SHIN, I.S.; SUZUKI, T. Preservative effect of combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds on carp fillets during convectional air-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 331-337, 2006.

MAIA, N. B.; BOVI, O. A.; DUARTE, F. R. Obtenção e análise do óleo essencial do gengibre: efeito de secagem e processamento. **Bragantia**, Campinas, v. 50, n. 1, p. 83-92, 1991.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animal, humans and foods: who's who?. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 6, p. 1332-1344, Dec. 2005.

MAISTRO, L. C. Alface minimamente processada: uma revisão. **Revista de Nutrição**, São Paulo, v.14, n. 3, p. 119-224, set. /dez. 2001.

MANGIA, A. H.; DUARTE, A. N.; DUARTE, R.; SILVA, L. A.; BRAVO, V. L.; LEAL, M.C. Aetiology of acute diarrhea in hospitalized children in Rio of Janeiro city, Brazil. **Journal Tropical of Pediatrics**, v. 39, n. 6, p. 365-367, 1993.

MANNING, P.A.; MEYER, T.F. Type-4 pili: biogenesis, adhesins, protein export and DNA import. **Gene**, v. 192, n.1, p. 1-198, 1997.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bio-impedometric method. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1017-1023, 1999.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 187-195, 2001.

MARRIOTT, P. J.; SHELLIE, R.; CORNWELL, C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 936, n. 1-2, p. 1-22, 2001.

MARTÍNEZ-ROMERO, D.; GUILLÉN, F.; VALVERDE, J.M.; BAILÉN, G.; ZAPATA, P.; SERRANO, M.; CASTILLO, S.; VALERO, D. Influence of cravacrol on survival of *Botrytis cinérea* inoculated in table grapes. **Internatonal of Food Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 144-148, 2007.

MARTINS, A.P.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, A.; CUNHA, P.; VILA, R.; CAMIGUERAL, S.; MAZZONI, V.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Essential oil composition and antimicrobial activity of three *Zingiberaceae* from São Tomé e Príncipe. **Revista Brasileira de Planta Medicinai**s, v. 67, p. 580-584, 2001.

MARTINS, M.F.; ROSSI, N. M. M.; FERREIRA, A.; BROCCHI, M.; YANO, T.; CASTRO, A. F. P. ; SILVEIRA, W. D. Pathogenic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from newborn piglets with diarrhea in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.76, p.51-59, 2000.

MARTINS, P.M. **Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essência de capim-limão (*Cymbopogonm cytratus* (D.C.) STAPF)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2000, 91p.

MASSILIA, R.M.R.; MELGAR, J.M.; BELLOSO, O.M. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella* Enteretididis, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in fruit juices. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 7, p. 1579-1586, 2006.

MATA, A. R.; NELSON, D, L.; AFONSO, R. J. C. F.; GLÓRIA, M. B. A.; JUNQUEIRA, R. G. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 151-157, jan.-mar. 2004.

MATOS, F.J.A. Introdução à fotoquímica experimental. Fortaleza: EUFC, 1988.

MAUL, A.A.; WASICKY, R.; BACCHI, E.M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.5, n. 2, p. 185-200, 1998.

MAZZANTI, G.; BATTINELLI, L.; SALVATORE, G. Antimicrobial properties of the linalool-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* (Lamiaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 5, p. 289-294, 1998.

McDANIELS, T.K.; JARVIS, K.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus the enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.

McMAHON, M.A.S.; WILSON, I.G. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n. 1-2, p. 155-162, 2001.

MEAD, P.S.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7. **The Lancet**, v. 352, n. 9135, p. 1207-1212, 1998.

MEENA, M.R.; SETHI, V. Antimicrobial activity of essential oils from species. **Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 68-70, 1994.

MELO, P. C. T. **Panorama atual da cadeia de produção de hortaliças no Brasil**. Associação Brasileira de Horticultura. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/Biblioteca/Default.asp?id=4925>. Acesso em 25 de Ago. de 2009.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M. P. **Pathogenic *Escherichia coli***. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations for Foods*. 4th, Washington: APHA, 2001, cap. 35, p. 331-341.

MESQUITA, V.C.L.; SERRA, C.M.B.; BASTOS, O.M.P.; UCHOA, C.M.A. Contaminação por enteroparasitos em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 363-6, 1999.

MIELE, M.; DONDERO, R.; CIARALLO, G.; MAZZEI, M. Methyleugenol in *Ocimum basilicum* L. Cv. Genovese Gigante. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 517-521, 2001.

MIKISHIMA, N. **Mapeamento da produção e consumo de hortaliças no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 2007, 7p.

MILLAR, J.G. Rapid and simple isolation de zingiberene from ginger essential oil. **Journal Natural Products**, v. 61, n. 8, p. 1025-1026, 1998.

MIYAZAWA, M.; KAMEOKA, H. Volatile flavor components of zingiberis rhizoma (*Zingiber officinale* Rosc). **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 2961-2963, 1988.

MIYAZAWA, M.; KHATOUNIAN, C.A.; ODENATH-PENHA, L. A. Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. **Agroecologia Hoje**, n. 2, p. 23, 2001.

MOREIRA, G. C.; CARNEIRO, M.S.; NATARO, J.P.; TRABULSI, L.R.; ELIAS, W. P. Role of type 1 fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 226, n. 1, p. 79-85, 2003.

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; VALLE, C.E.; ROURA, S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 565-570, 2005.

MORETTI, C. L. Boas práticas agrícolas para a produção de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, julho, 2003 – Suplemento CD.

MORGAN, D.; NEWMAN, C.P.; HUTCHINSON, D.N.; WALKER, A.M.; ROWE, B.; MAJID, F. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with the consumption of yogurt. **Epidemiology and Infection**, v. 111, p. 181-187, 1993.

MORGAN, R. **Enciclopédia das Ervas e Plantas Medicinais**. São Paulo: Hemus, 1994.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, v. 13, n. 4-5, p. 289-292, 2002.

MYTLE, N.; ANDERSON, G.L.; DOYLE, M.P.; SMITH, M.A. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**, v. 17, n.2, p. 102-107, 2006.

NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T.U.; BANDO, E.; MELO, A.F.N.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B. P. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 94, n. 5, p. 675-678, Sep./Oct., 1999.

NACMCF - NATIONAL COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. **Food Control**, v. 10, p. 117-143, 1999.

NASCIMENTO, M. S. **Avaliação comparativa de tratamentos químicos na sanitização de frutas e verduras**. 2002. 115f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2002.

NASCIMENTO, A. R. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de sururu (*Mytella falcata*)**. Lavras. 2004, 91f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2004.

NASCIMENTO, A. R.; MOUCHREK FILHO, J. E.; MOUCHREK FILHO, V. E.; MARTINS, A. G. L. A.; BAYMA, A. B.; GOMES, S. V.; MARINHO, S. C. Incidência de *Escherichia coli* e *Salmonella* em alface (*Lactuca sativa*). **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n.128, p.121-124, jan. /fev. 2005.

NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Current Opinion in Gastroenterology**. v. 21, n. 1, p. 4–8, 2005.

NATARO, J. P.; LEVINE, M. M. *Escherichia coli* diseases in humans. In: GYLES, C. L. (Ed.). **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 285-333.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.88, n. 1, p. 142-201, 1998.

NATTA, L.; ORAPIN, K.; KRITTIKA, N.; PANTIP, B. Essential oil five *Zingiberaceae* for anti food-borne bacteria. **International Food Research Journal**, v. 15, n. 3, p. 1-10, 2008.

NICAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 382-388, 1994.

NORAJIT, K.; LAOHAKUNJIT, N.; KERDCHOECHUEN, O. Antibacterial effect of five *Zingiberaceae* essential oils. **Moleculas**, v. 12, p. 2047-2060, 2007.

NOWICKI, B.; LABIGNE, A.; MOSELEY, S.; HULL, R.; HULL, S.; MOULDS, J. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 1, Jan., p.279-81, 1990.

ODUMERU, J. A.; MITCHELL, S. J.; ALVES, D. M. LYNCH, J. A.; YEE, A. J. Assesment on the microbiological quality of read-to-use vegetables for the healthcare food services. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 8, p. 954-960, 1997.

OKPEKON, T.; YOLOU, S.; GLEYE, C.; ROBLOT, F.; LOISEAU, P.; GRELOIER, P.; FRAPPIER, F.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Antiparasitic activities of medical plants used in Ivory Coast. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 90, n. 1, p. 91-97, 2004.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aspectos sanitários da contaminação de hortaliças por enteroparasitas. **Comunidade Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.16, n.1/2, p.27-32, 1992.

ONYENEKWE, P.C.; HASHIMOTO, S. The composition of the essential oil of dried Nigerian ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **European Food Research and Technology**, v. 209, n. 6, p. 407- 410, 1999.

ORSKOV, I.; WACHSMUTH, I. K.; TAYLOR, D.N.; ECHEVERIA, P.; ROWE, B.; SAKAZAKI, R.; ORSKOV, F. Two new *Escherichia coli* O groups: O172 from "Shigella-like" toxin producing strains (EHEC) and O173 from enteroinvasive *E. coli* (EIEC). **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 90, n. 1, p. 30-32, 1991.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2006.

ÖZCAN, M.; CHALCHAT, J.C. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 20, n. 6, p. 223-228, 2002.

PACHECO, M. S. R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, H. G. G.; CANDIDO, V. L. P.; GOMES, A. H. S.; ARMELIN, J. M.; BERNARDES, R. Condições higiênico-sanitárias de verduras e legumes comercializadas no Ceagesp de Sorocaba-SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n.101, p.50-51, 2002.

PADHYE, N. V.; DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 7, p. 555-565, 1992.

PALÚ, A.P; TIBANA, L.M; MIGUEL, M.A.L. Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas, servidos em restaurantes *self-services* privados, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, p.67-74, 2002.

PASTER, N.; MENASHEROV, M.; RAVID, U.; JUVEN, B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking store grain. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 1, p. 81-85, 1995.

PATON, A.; PUTIEVSKY, E. Taxonomic problems and cytotoxic relationships between and within varieties of *Ocimum basilicum* and related species (*Labiatae*). **Kew Bull**, v. 51, p. 509-524, 1996.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Siga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.

PEARCE, M. C., C. JENKINS, L. VALI, A. W. SMITH, H. I. KNIGHT, T. CHEASTY, H. R. SMITH, G. J. GUNN, M. E. WOOLHOUSE, S. G. AMYES, AND G. FRANKEL. Temporal shedding patterns and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a cohort of beef calves and their dams. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1708- 1716, 2004.

PELCZAR, J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, R. N. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, vol.1, 2, São Paulo, SP: Makron Books, 1996.

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 624-632, jul.-set., 2007.

PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. **The Journal Infectious Diseases**, v.181, n. 4, p. 1.496-1.500, 2000.

POLITEO, O., JUKIC, M., MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 379-385, 2007.

PORTE, A., GODOY, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedade antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim CEPPA**, v. 19, n. 2, p. 193-210, jul./dez. 2001.

PREVOST, M.C; LESOURD, M.; ARPIN, M.; VERNEL, F.; MOUNIER, J.; HELLIO, R.; SANSONETTI, P.J. Unipolar reorganization of F-actin layer at bacterial division and bundling of actin filaments by plastin correlate with movement of *Shigella flexneri* within HeLa cells. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 4088-4099, 1992.

RATINER, Y. A. New flagellin-specifying genes in some *Escherichia coli* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 4, p. 979-984, 1998.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (*Moraceae*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RIBEIRO, A. S.; ALVES, L. M. C.; GUERRA, R. M. S. N. C.; COSTA, F. N. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de alfaces e água de irrigação de hortas da ilha de São Luís, MA. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 130, p. 20-23, abr. 2005.

ROCHA, C. M. B. M.; RODRIGUES, L. S.; COSTA, C. C.; OLIVEIRA, P. R.; SILVA, I. J.; DE JESUS, E. F.; GOMES, E. Avaliação da relação entre os tipos de mananciais e a qualidade de água utilizada na zona rural do município de Lavras-MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EPIDEMIOLOGIA, 5., 2002, Curitiba. **Resumos...** Curitiba: SBE, 2002. 458p.

RODRIGUES, J.; SCALETISKY, I.C.A.; CAMPOS, L.C.; GOMES, T.A.T.; WHITTAM, S.T.; TRABULSI, L.R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2.680-2.686, 1996.

RODRÍGUEZ-ANGELES, G. Diagnosis and main characteristics of *Escherichia coli* pathogenic groups. **Revista do Instituto Nacional de Salud Pública do México**, v. 44, n. 5, p. 464-475, set. /out., 2002.

ROSA, A.C.; MARIANO, A.T.; PEREIRA, A.M.; TIBANA, A.; GOMES, T.A.T.; ANDRADE, J.R. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 781-790, 1998.

ROTTNER, K.; STRADAL, T.E.B.; WEHLAND, J. Bacteria-host cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. **Developmental Cell**, v. 9, n. 1, p. 3-17, 2005.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 91, n. 4, p. 621-632, Aug. 2005.

SAFARIKOVÁ, M. SAFARIK, I. Immunomagnetic separation of *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from vegetables. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 36-39, 2001.

SAJJADI, S.E. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. **DARU**, v. 14, n. 3, p. 128-130, 2006.

SALVAT, A; ANTONNACI, L; FORTUNATO, R.H; SUAREZ, E.Y; GODOY, H.M. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, n.5, p.293-297, 2001.

SANTANA, L. R. R.; CARVALHO, R. D. S.; LEITE, C. C.; ALCÂNTARA, L. M.; OLIVEIRA, T. W. S.; RODRIGUES, B. M. Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.2, p. 264-269, abr.-jun., 2006.

SANTOS, A.S.; ALVES, S. M.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; ROCHA NETO, O.G. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Comunicado Técnico 99**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. p. 01-06, 2004.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA G. M.; DUARTE M.C.T., REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 273- 280, 2004.

SAVARINO, S.J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J.; CRAVIOTO, A.; MOLINA, J.; ECHEVERRIA, P.; BHAN, M.K.; LEVINE, M.M.; FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v.73, n. 4, p. 1019-1022, 1996.

SCHMIDT, H.; KERNBACH, C.; KARCH, H. Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O156: H7. **Microbiology**, v. 142, n. 4, p. 907-914, 1996.

SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; CHEATY, T. SAID, B.; WILLSHAW, G.A.; STOKES, N.; ROWE, B. Use of gene probes and adhesion tests to characterize *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. **Journal Medical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 438-443, 1996.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxin mechanism of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 1, p. 167-215, 1996.

SHALE, T.L.; STIRK, W.A.; VAN STADEN, J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 3, p.347-354, 1999.

SHARMA, S.; SACHDEVA, P.; VIRDI, J. S. Emerging water-borne pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5-6, p. 424-428, 2003.

SHUTERLAND, J. P.; BAYLISS, A. J.; BRAXTON, D. S. Predictive modeling of growth of *Escherichia coli* O157:H7:the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 29-49, 1995.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.

SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **MMBR - Microbiological and Molecular Biology Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILVA, C. S. M.; OLIVEIRA, A. M.; STANFORD, T. L. M. Enteroparasitas em vegetais: uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 109, p. 13-18, 2003.

SILVA, C.G.M.; ANDRADE, S.A.C.; STAMFORD, T.L.M. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp. e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v. 10, p. 63-69, 2005.

SILVA, J. A.; SILVA, W. D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 3, p. 175-196, 2006.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora, 2007.

SIMON, J.E.; QUINN, J.; MURRAY, R.G. Basil: a source of essential oils. In *Advances in New Crops*; Janik, J., Simon, J. E., Eds.; Timber Press: Portland, OR, 1990; pp. 484-489.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis, 2007.

SINGH, G.; KAPOOR, I.P.S.; SINGH, P.; HELUANI, C.S.; LAMPASONA, M.P.; CATALAN, C.A.N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 3295-3302, 2008.

SINHA, G.K.; GULATI, B.C. Antibacterial and antifungal activity of some essencials oils and some of their constituents. **Indian Perfume**, v.34, n. 2, p. 126-129, 1990.

SIXMAR, T.K.; KALK, H.; VAN ZANTEN, B.A.; DAUTER, A.; KINGMA, J.; WITHOLT, B.; HOL, W.G. Refined structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin, a close relative of cholera toxin. **Journal the Molecular Biology**, v. 230, n. 3, p. 890-918, 1993.

SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.J.E. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, n. 6, p. 1011-1022, 2002.

SMID, E. J.; KOEKEN, J. P. G.; GORRIS, L. G. M. **Fungicidal and fungistatic action of the secondary plant metabolites cinnamaldehyde and carvone**. In *Modern Fungicides and Antimicrobial Compounds*; LYR, H.; RUSSELL, P. E.; SISLER, H. D., Eds.; Intercept: Andover, U.K., 1996; pp 173-180.

SMITH, H.R.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G.A.; CAPRIOLI, A.; TOZZI, A.E.; COIA, E.; FISHER, I.S.T.; O'BRIEN, S.J.; FRUTH, A.; TSEHÂPE, H.; REILLY, W.J. Changing patterns of VTEC infection in Britain and continental Europe. IVC News 16. **Annals Istituto Superiore Di Sanita**, v. 15, n. 12, Suppl 1, 2002.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p.118-122. 1998.

SOARES, A. C. **Se bem não fizer, mal também não fará**. Revista Eletrônica de Ciências. n. 12, out. 2002. Disponível em: <http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_12/medicamento.html>. Acesso em 2 abr. 2009.

SOKOVIC, M.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. **European Journal Plant Pathology**, v. 116, p. 211-224, 2006.

SOLOMON, E.B.; YARON, S.; MATTHEWS, K. R. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 397-400, 2002.

SORIANO, J.M.; RICO, H.; MOLTÓ, J.C.; MANES, J. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. **International Journal of Food Microbiology**. v. 58, p.123-128, 2000.

SRINIVASAN, D; NATHAN, S; SURESH, T; PERUMALSAMY, P.L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, p.217-220, 2001.

STATSOFT. INC. Statistical for Windows [Computer program]; Tulsa: **StatSoft Inc.**, 1996.

STONE, K.D.; ZHANG, H.Z.; CARLSON, L.K.; DONNENBERG, M.S. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient to biogenesis of type IV pilus. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 313-323, 1996.

STRACHAN, N.J.C.; DOYLE, M.P.; KASUGA, F.; ROTARIU, O.; OGDEN, I.D. Dose response modeling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 35-47, 2005.

STROM, M.S.; LORY, S. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. **Annual Review Microbiology**, v.47, p. 565-596, 1993.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NORWALK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 19, n. 1, p. 1-30, 2000.

SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S.W. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3197-3207, 2003.

SVOBODA, K.P.; HAMPSON, J.B. **Bioactivity of essential oil of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities.** In: Speciality Chemicals for the 21st Century, Paris, France, ADEME, 1999, pp. 43-49. ADEME/IENICA International Seminar, 16-17 September, 1999.

SWINBANKS, D. Japan shuns radishes after possible link to *E. coli*. **Nature**, London, v. 382, n. 6592, p. 567-572, aug. 1996.

TADDEI, C.R.; MORENO, A.C.R.; FILHO, A.F.; MONTENOR, L.P.G.; MARTINEZ, M.B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, n. 2, p. 249-253, 2003.

TAUSCHEK, M.; CORREL, M.J.; STRUGNELL, R.A.; ROBINS-BROWNE, R.M. Identification of the protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American**, v. 99, n. 10, p. 7066-7071, 2002.

TELICI, I.; BAYRAM, E.; YILMAZ, G.; AVCI, B. Variability in essential oil composition of Turkish basil (*Ocimum basilicum* L.). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 6, p. 489-497, 2006.

TENENBERG, S.; HIRST, T.R.; ANGSTROM, J.; KARISSON, A. Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-stable toxin in infant rabbit small intestine. **Glycoconj Journal**, v. 11, p. 533-540, 1994.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; TEPE, A.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepta flavida* Hud.-Mor. from Turkey. **Food Chemistry**, v. 103, 1358-1364, 2007.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Compendium de fitoterapia: herbarium**. 3^a. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995. 317 p.

TEUSCHER, E. **Pharmazeutische Biologie**. Braunschweig: Vieweg, 1990.

THORPE, C.M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Clinical Infections Diseases**, v. 38, p. 1298-1303, 2004.

TIQUIA, S.M.; WAN, J.H.C.; TAM, N.F.Y. Microbial population dynamics and enzyme activities during composting. **Compost Science and Utilization**, v.10, n.2, p.150-161, 2002.

TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER, J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 18-29, 2005.

TOURE, A.; XIAOMING, Z. Gas chromatographic analysis of volatile components of guinean and chinese ginger oils (*Zingiber officinale*) extracted by steam distillation. **Journal of Agromomy**, v. 6, n. 2, p. 350-355, 2007.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 5^a edição. São Paulo: Atheneu, 2008, 780p.

TRABULSI, L.R., KELLER, R., GOMES, T.A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

TRABULSI, L.R.; CAMPOS, L.C.; WHITTAN, T.S.; GOMES, TAT.; RODRIGUES, J., GONÇALVES, A.G. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 1-6, 1996.

TRAN VAN NHIEU, G.; BOURDET-SICARD, R.; DUMENIL, G.; BLOCKER, A.; SANSONETTI, P.J. Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 187-193, 2000.

TRELEAVEN, B.E.; DIALLO, A. A.; RENSHAW, J.R.; E.C. Spurious hydrogen sulfide production by *Providencia* and *Escherichia coli* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 750-752, 1980.

TREVISAN, M. T. S.; VASCONCELOS, S.M.G.; PFUNDSTEIN, B.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R.W. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 378-4382, 2006.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N.K.; SHUKLA, A.K. Use of the essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 39-46, 2008.

TURNER, C. The thermal inactivation of *Escherichia coli* in straw and pig manure. **Bioresource of Technology**, v.84, n. 1, p.57-61, 2002.

TZIPORI, S.; MONTNARO, J.; ROBINS-BROWNE, R.M.; VIAL, P.; GIBSON, R.; LEVINE, M. M. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in gnotobiotic piglet gastroenteritis model. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 12, p. 5302-5306, 1992.

ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of actions of cravacol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.

VARNADO, C. L.; HERTWIG, K. M.; THOMAS, R.; ROBERTS, J. K.;GOODWIN, D. C. Properties of a novel periplasmic catalase-peroxidase from *Escherichia coli* O157:H7. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 421, n. 1, p. 166-174, 2005.

VASUDARAN, P.; KASHYAP, S.; SHARMA, S. Bioactive botanicals from basil (*Ocimum* sp.). **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 58, n. 5, p. 332-338, 1999.

VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; DIAS, Â. M. G.; GOMES, T. A. T.; MEDEIROS, M. I. C.; ROCHA, M. M. M.; GUTH, B. E. C. Virulence Properties and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 2, p. 903- 905, Feb. 2004.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Mediciniais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERNOZY-ROZAND, C., MONTET, M.P., LEQUERREC, F., SERILLON, E., TILLY, B., BAVAI, C., RAY-GUENIOT, S., BOUVET, J., MAZUY-CRUCHAUDET, C. AND RICHARD, Y. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 3, p. 473-8, 2002.

VIEIRA, R.F.; SIMON, J.E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economic Botany**, v.54, n. 2, p. 207-16, 2000.

VINÃ, A.; MURILLO, E. Essential oil composition from twelve varieties of basil (*Ocimum* spp.) grown in Colombia. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 5, p. 744-749, 2003.

WACHTEL, M.R.; WHITELAND, L.C.; MANDRELL, R.E. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 1, p. 18-25, 2002.

WAI, S. N.; TAKADE, A.; AMAKO, K. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 135, n. 1, p. 17-22, 1996.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2567-2570, 1996.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heatstable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains pathogenic for humans. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 4, p. 1441-1445, 1996.

YAMAMOTO, T.; NAKAZAWA, M. Detection and sequences of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 223-227, 1997.

YU, Y.; HUANG, T.; YANG, B.; LIU, X.; DUAN, G. Development of gas chromatography-mass spectrometry with microwave distillation and simultaneous solid-phase microextraction for rapid determination of volatile constituents in ginger. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 1, p. 24-31, 2007.

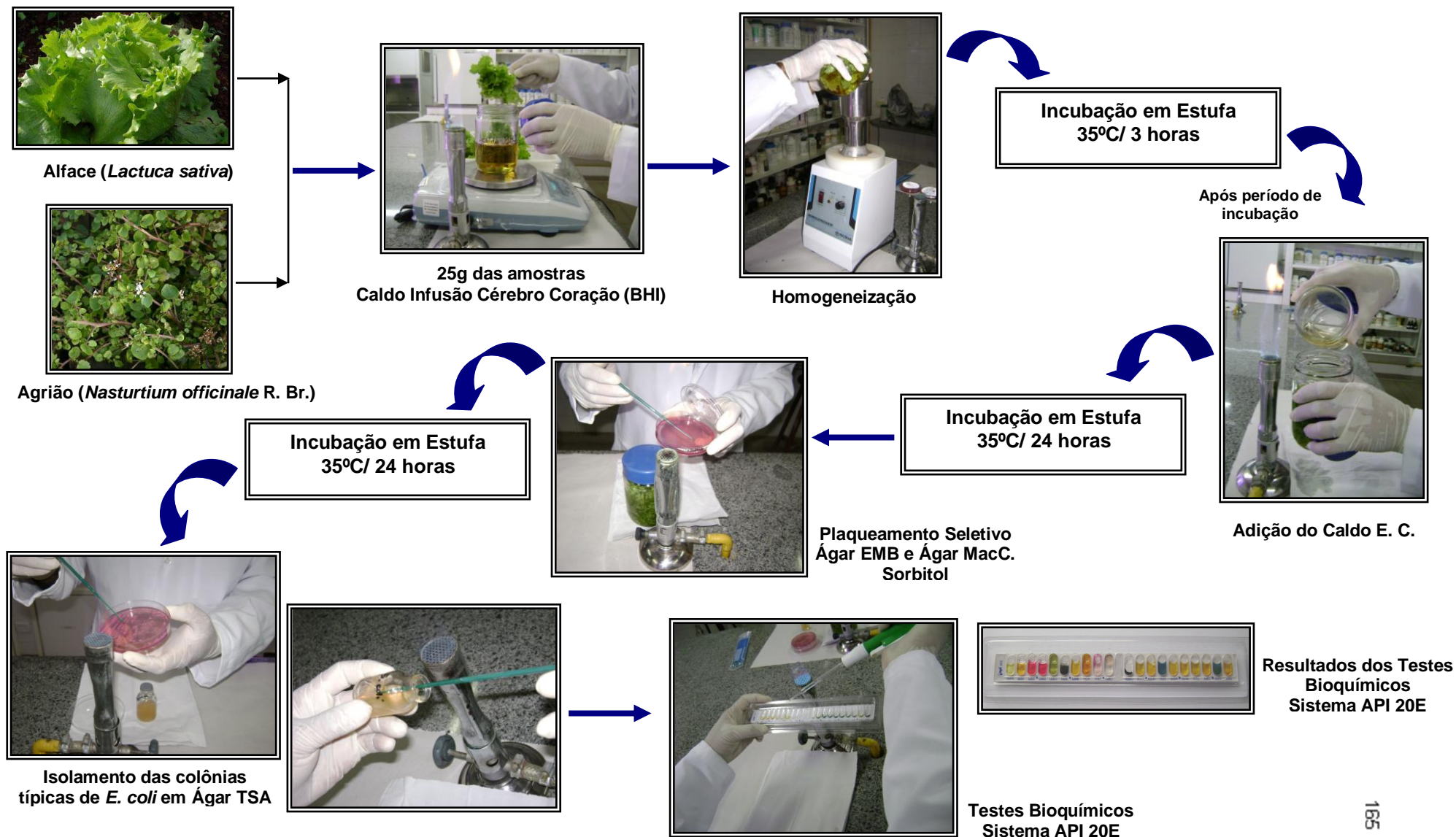
ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, n. 1, p. 57-76, 2002.

ZARATE, R.; SUKRASNO; YEOMAN, M. M. Application of two rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. **Journal of Chromatography**, v. 609, n. 1-2, p. 407 - 413, 1992.

ZHANG, X.; MCDANIEL, A.D.; WOLF, L.E.; KEUSCH, G.T.; WALDOR, M.K.; ACHESON, D.W. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. **Journal Infectious Disease**, v. 181, p. 664-670, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Isolamento e identificação de *Escherichia coli* nas amostras de alface e agrião cultivados pelos sistemas orgânico e hidropônico.



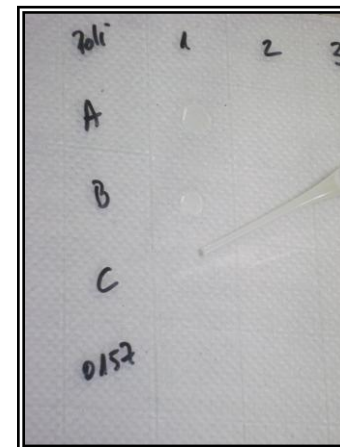
APÊNDICE B. Identificação dos sorogrupos de *Escherichia coli* isoladas de alfaces e agrião cultivados pelos sistemas orgânico e hidropônico.



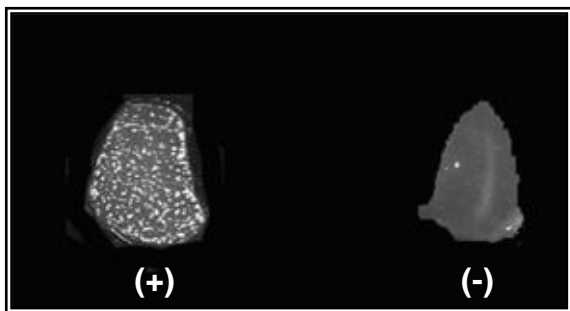
Adição de 1mL de H₂O estéril à cepa (suspensão)



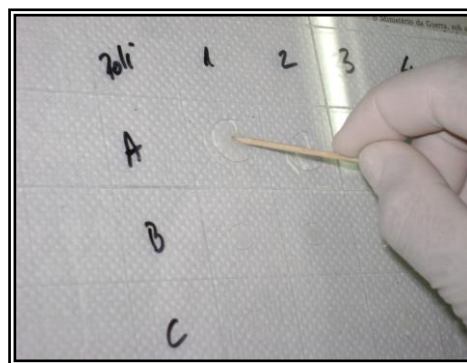
Retirada do inóculo (suspensão)



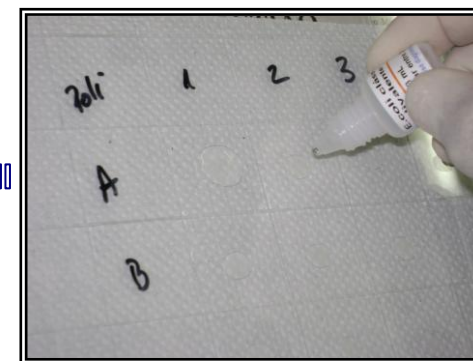
Adição do inóculo na lâmina



Reação positiva - aglutinação do soro

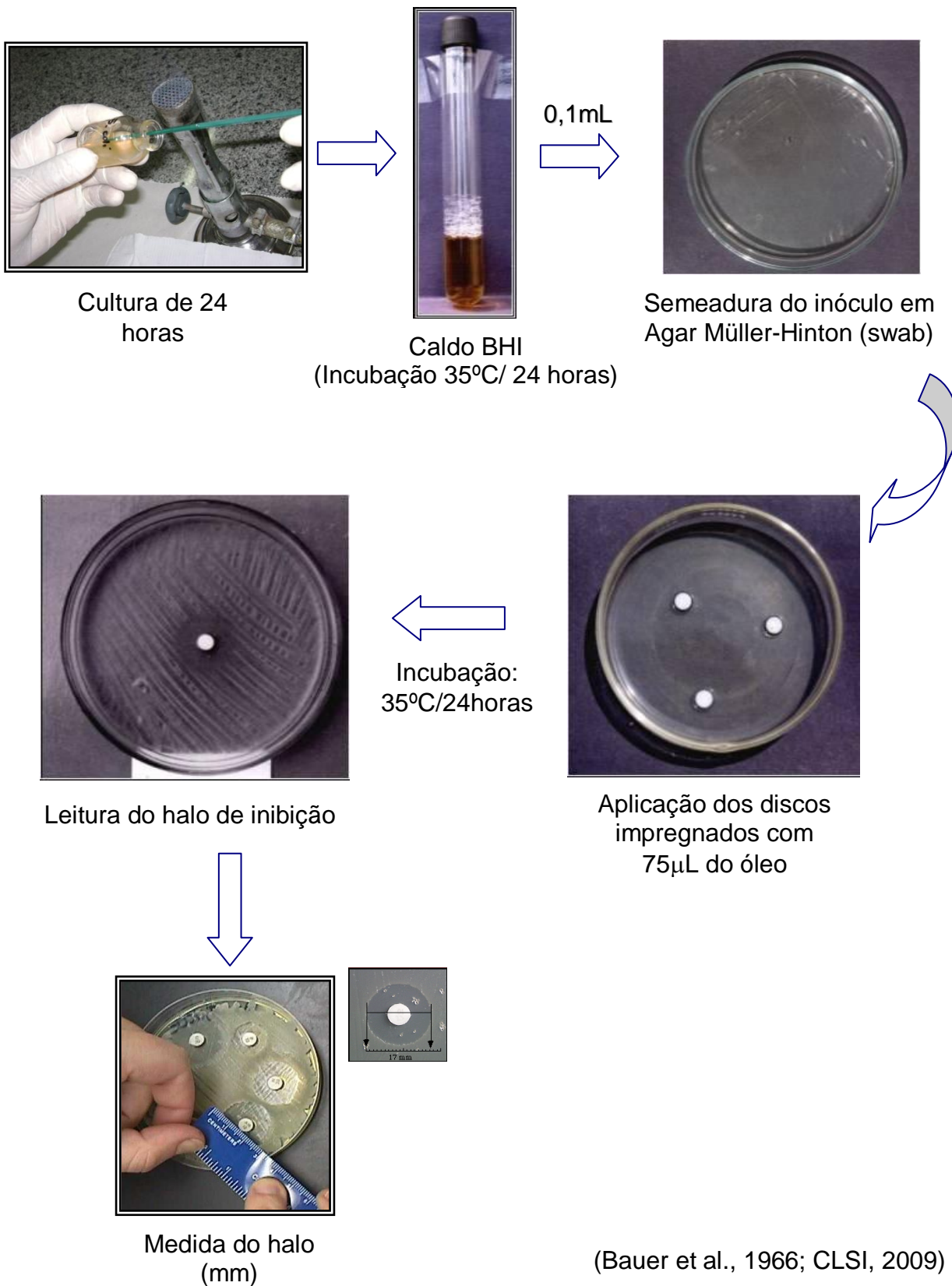


Homogeneização do inóculo + soro

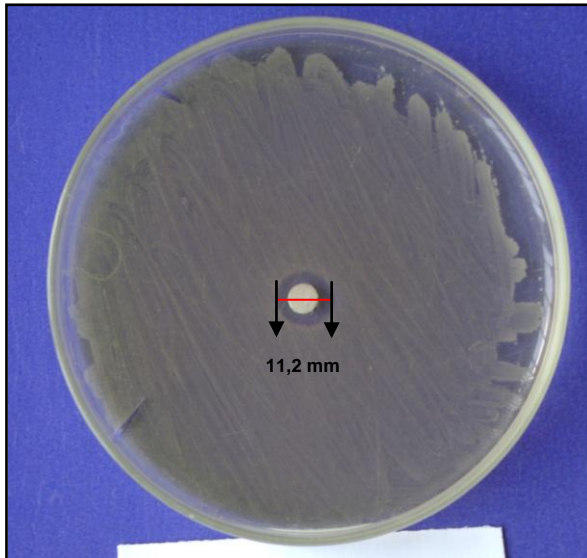


Adição do soro ao inóculo - Teste dos soros polivalentes e monovalentes para EPEC clássica e EIEC

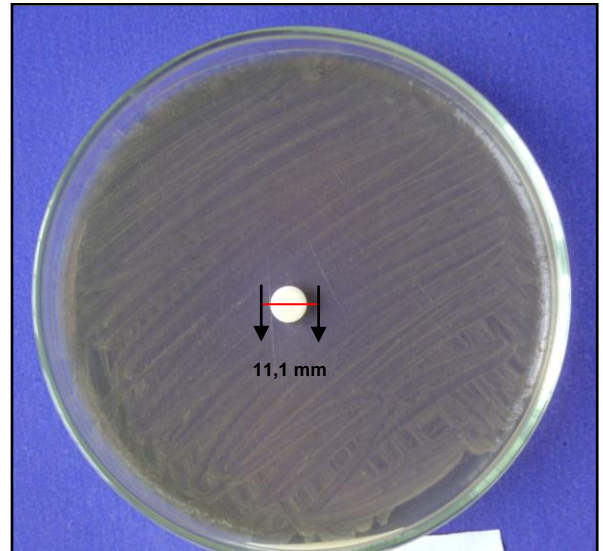
APÊNDICE C. Esquema do teste para a avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de manjeriço e gengibre frente a sorogrupos de *E. coli* EPEC.



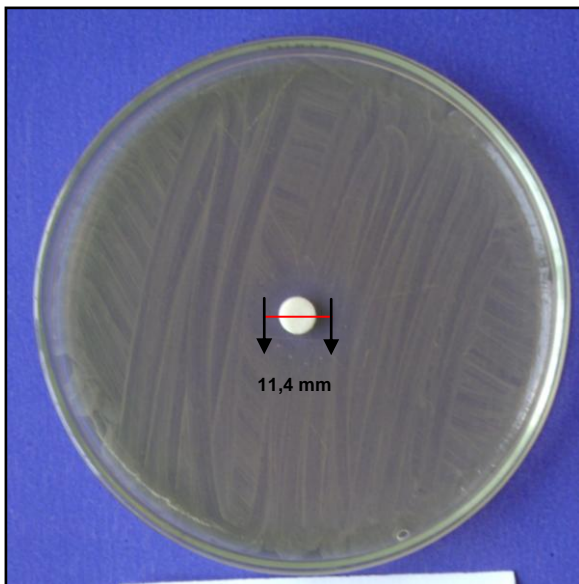
APÊNDICE D. Halos de inibição resultantes da ação antibacteriana do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) frente aos sorogrupos de *Escherichia coli* EPEC isoladas das amostras de alface cultivada pelo sistema orgânico.



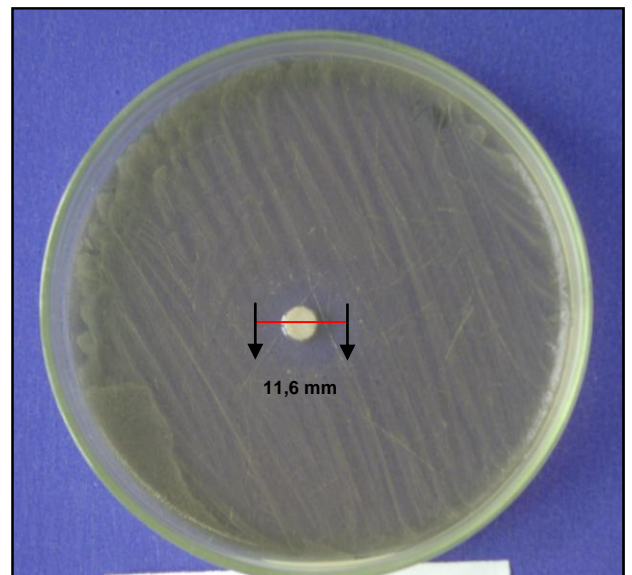
Escherichia coli EPEC O55



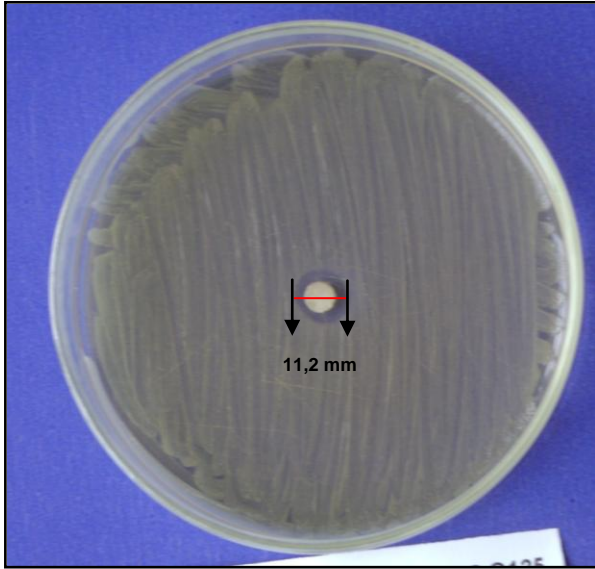
Escherichia coli EPEC O26



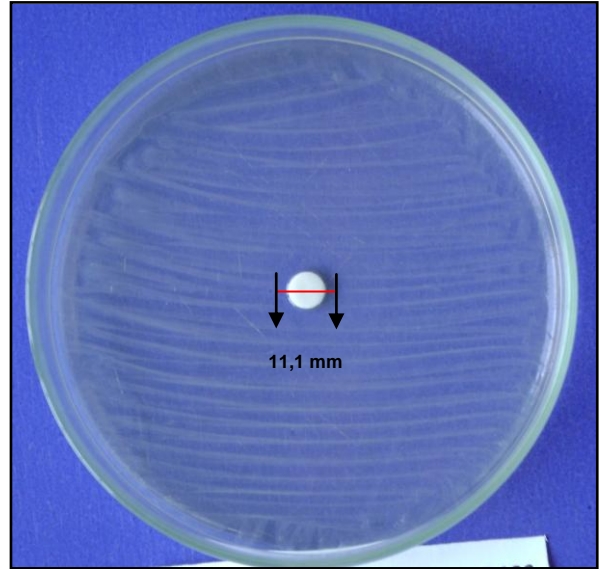
Escherichia coli EPEC O111



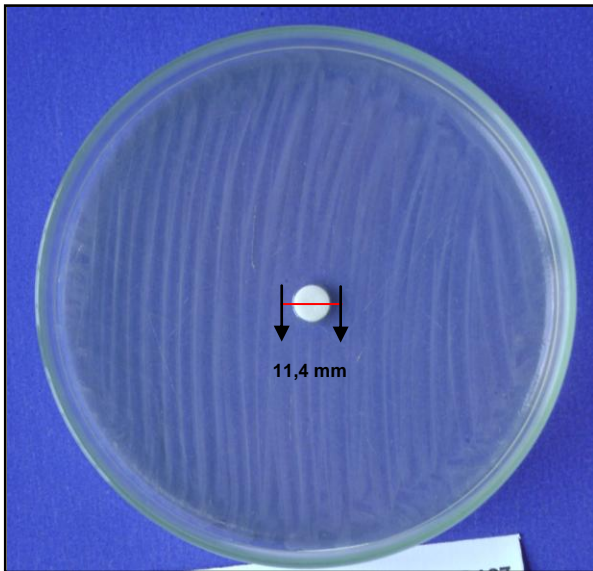
Escherichia coli EPEC O114



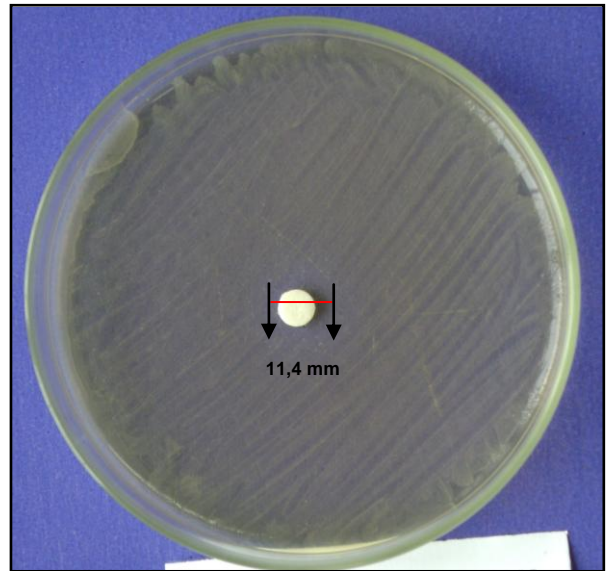
Escherichia coli EPEC O125



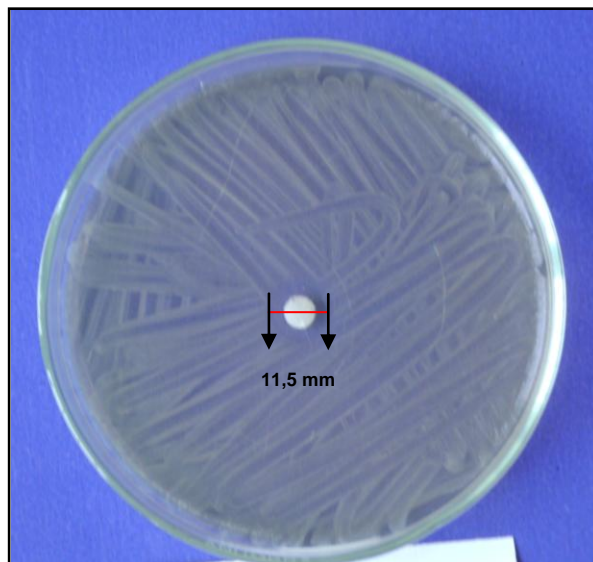
Escherichia coli EPEC O126



Escherichia coli EPEC O127

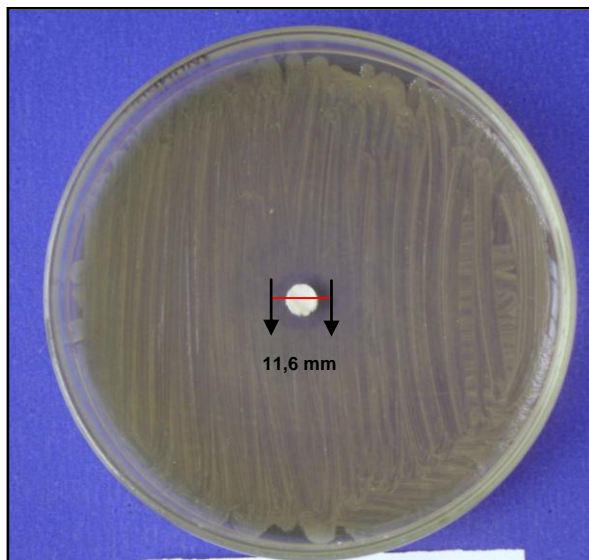


Escherichia coli EPEC O142

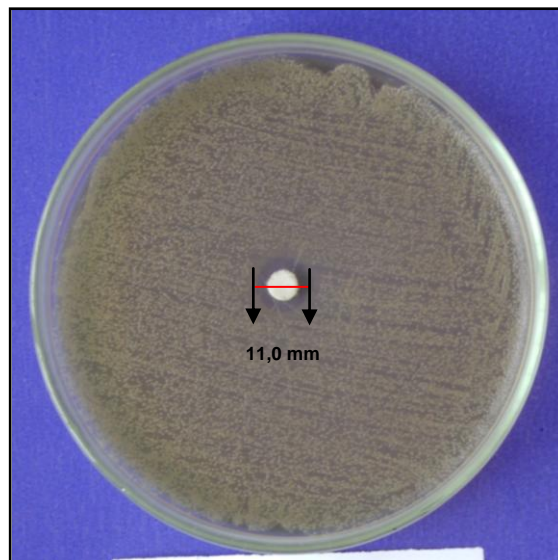


Escherichia coli EPEC O157

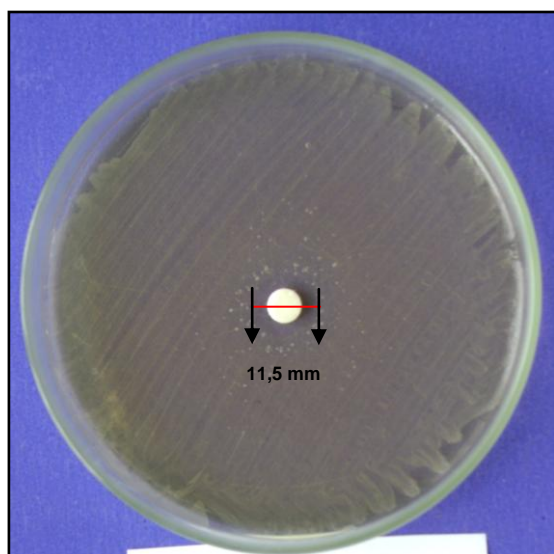
APÊNDICE E. Halos de inibição resultantes da ação antibacteriana do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) frente aos sorogrupos de *Escherichia coli* EPEC isoladas das amostras de alface cultivada pelo sistema hidropônico.



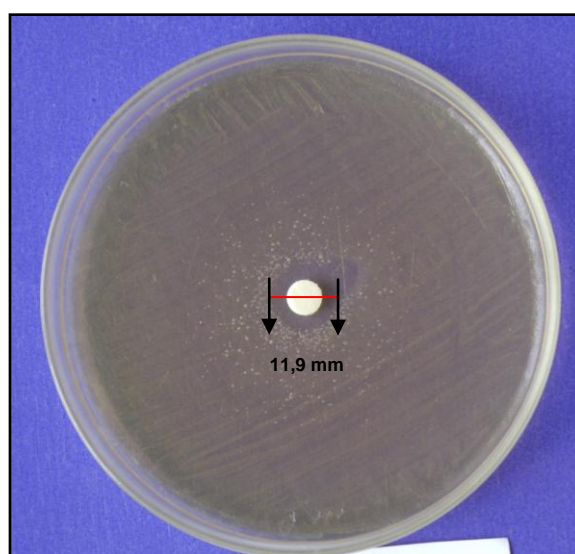
Escherichia coli EPEC O55



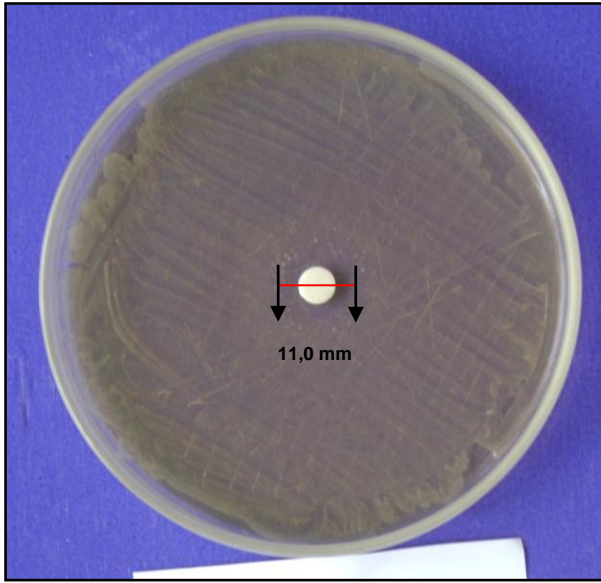
Escherichia coli EPEC O111



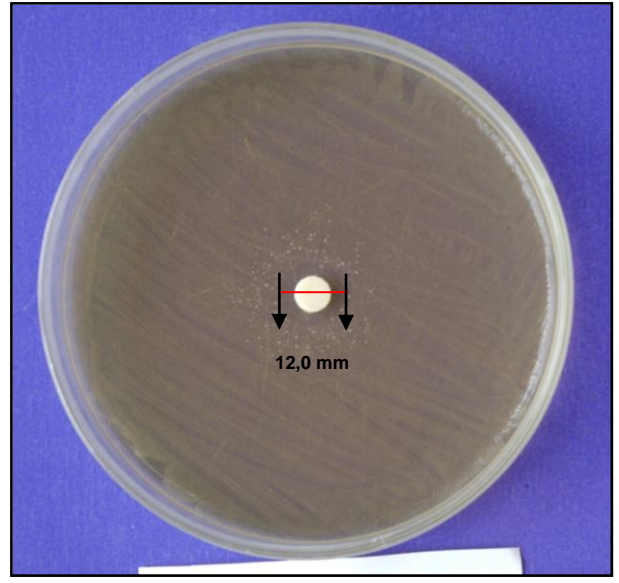
Escherichia coli EPEC O114



Escherichia coli EPEC O125

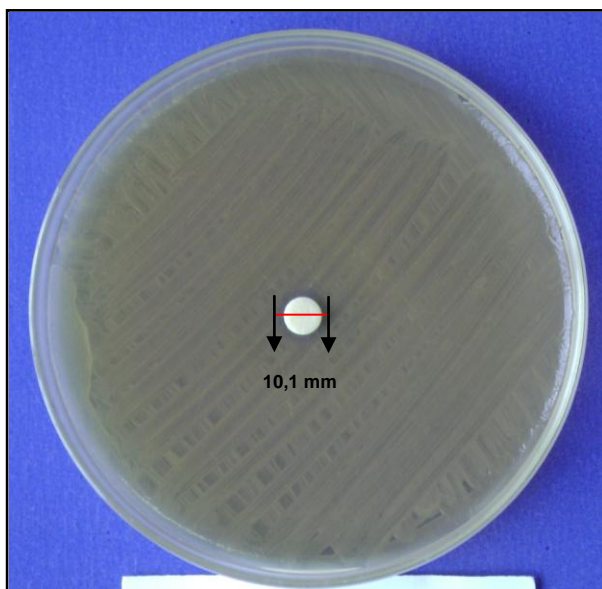


Escherichia coli EPEC O127

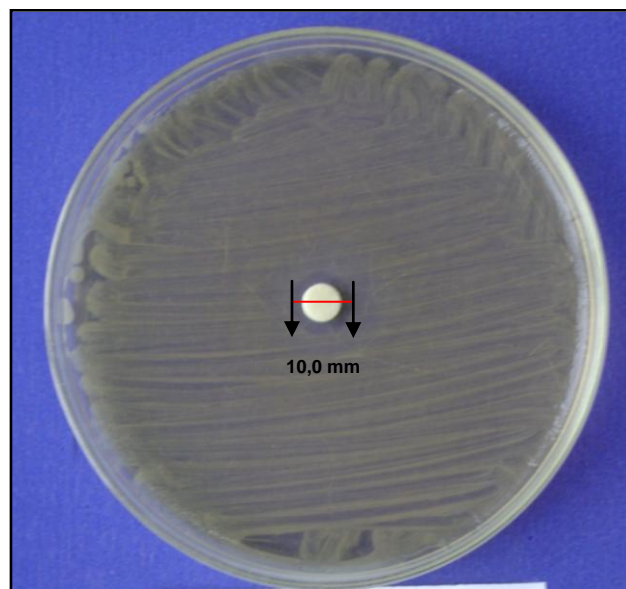


Escherichia coli EPEC O142

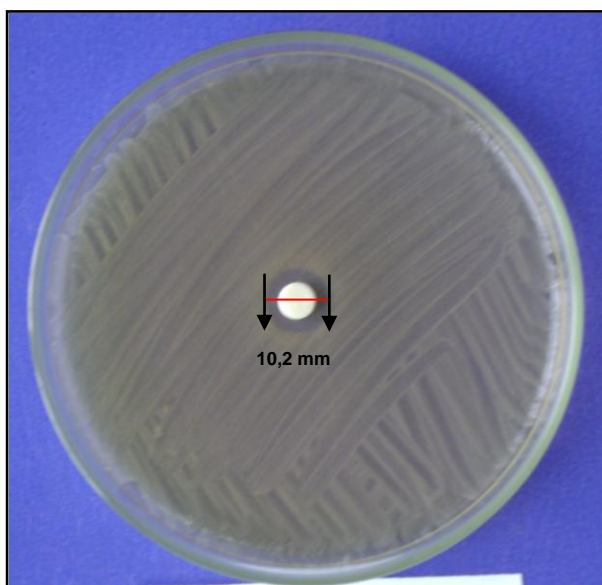
APÊNDICE F. Halos de inibição resultantes da ação antibacteriana do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) frente aos sorogrupos de *Escherichia coli* EPEC isoladas das amostras de alface cultivada pelo sistema orgânico.



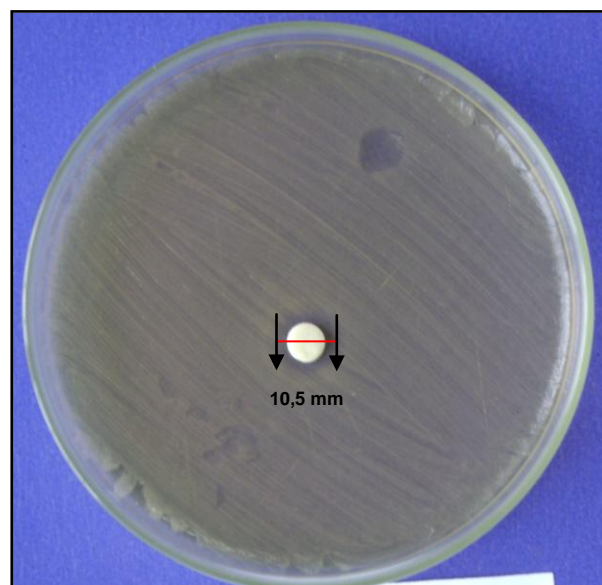
Escherichia coli EPEC O55



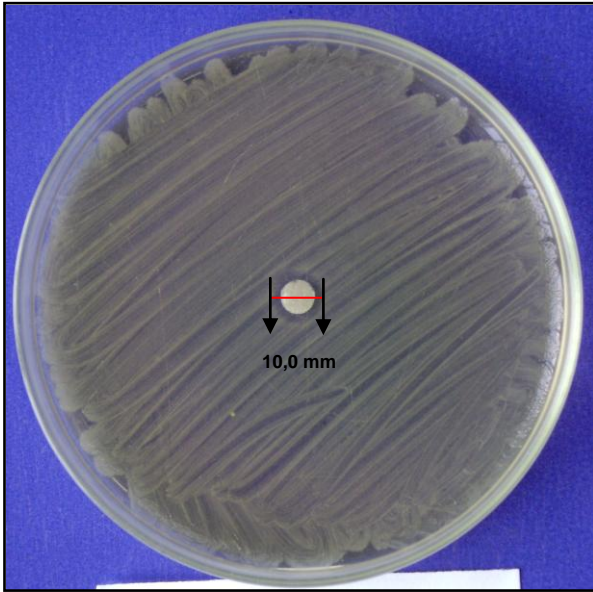
Escherichia coli EPEC O26



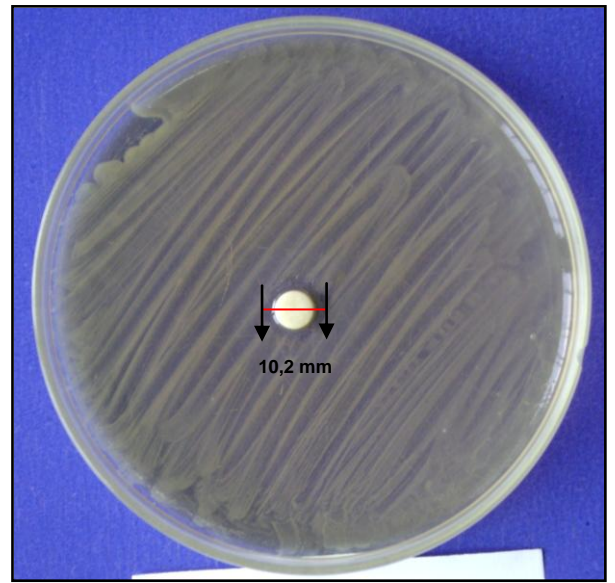
Escherichia coli EPEC O111



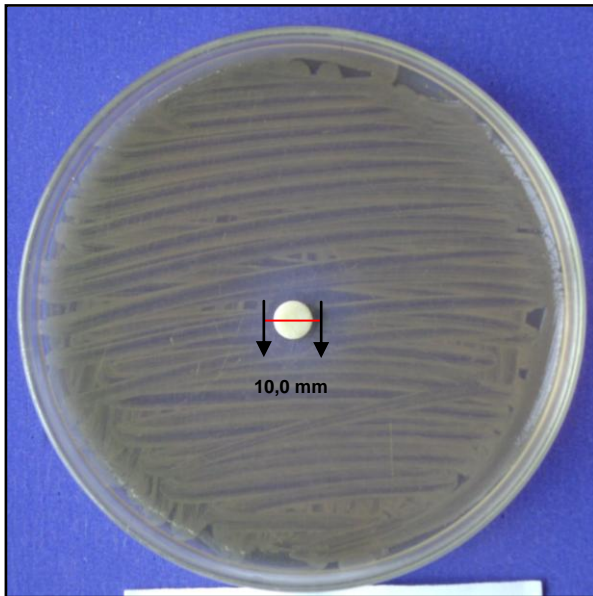
Escherichia coli EPEC O114



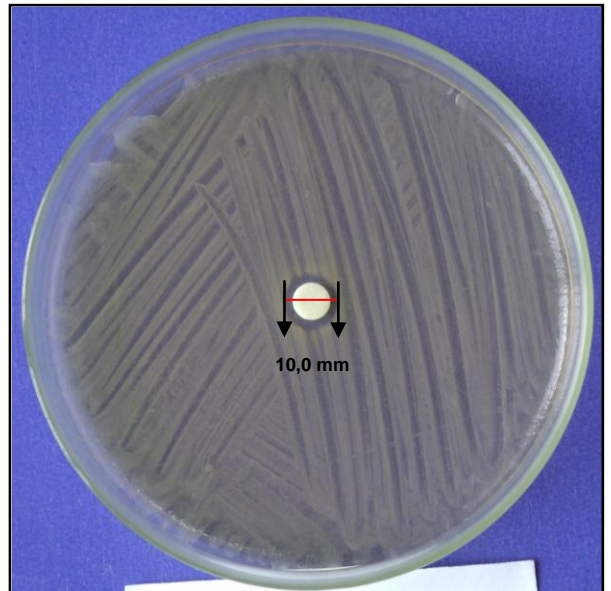
Escherichia coli EPEC O125



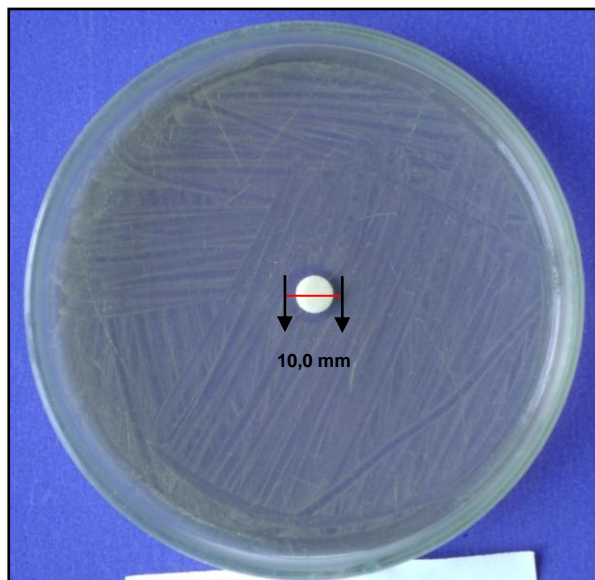
Escherichia coli EPEC O126



Escherichia coli EPEC O127

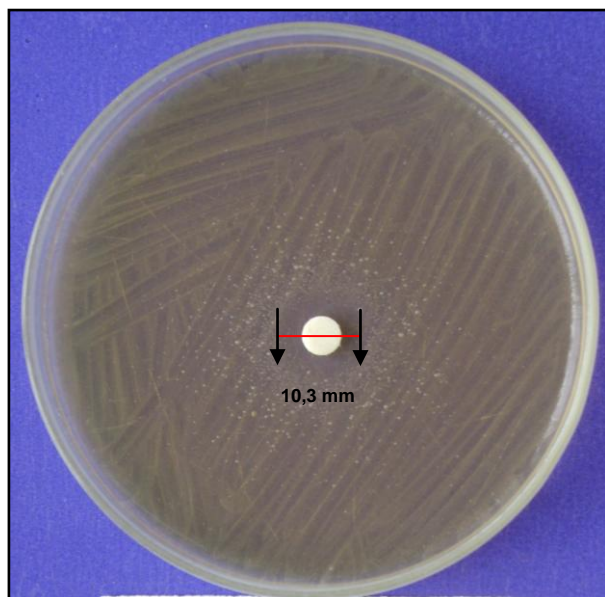


Escherichia coli EPEC O142

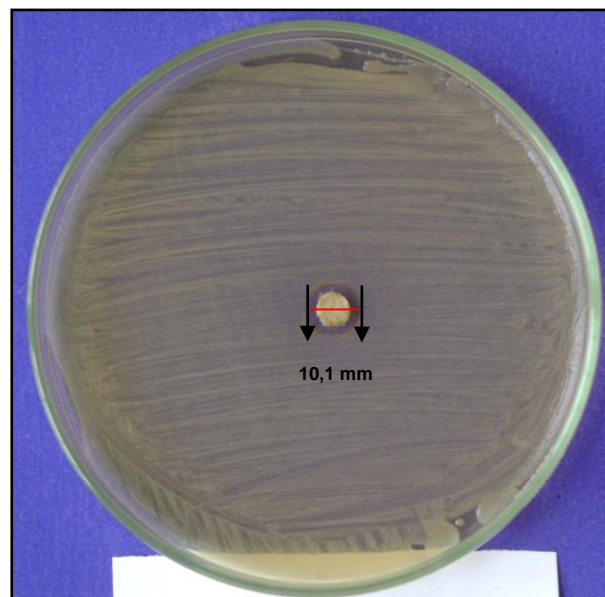


Escherichia coli EPEC O157

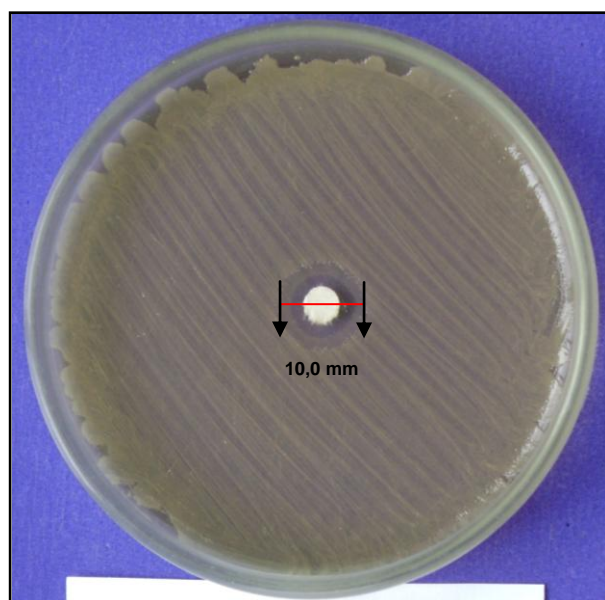
APÊNDICE G. Halos de inibição resultantes da ação antibacteriana do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) frente aos sorogrupos de *Escherichia coli* EPEC isoladas das amostras de alface cultivada pelo sistema hidropônico.



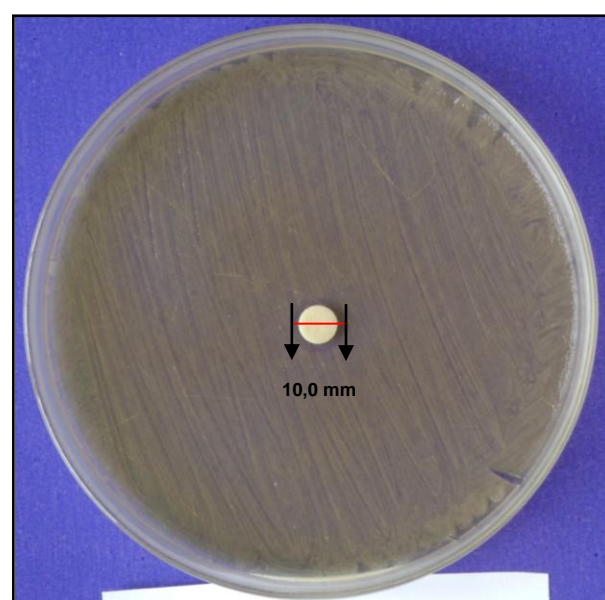
Escherichia coli EPEC O55



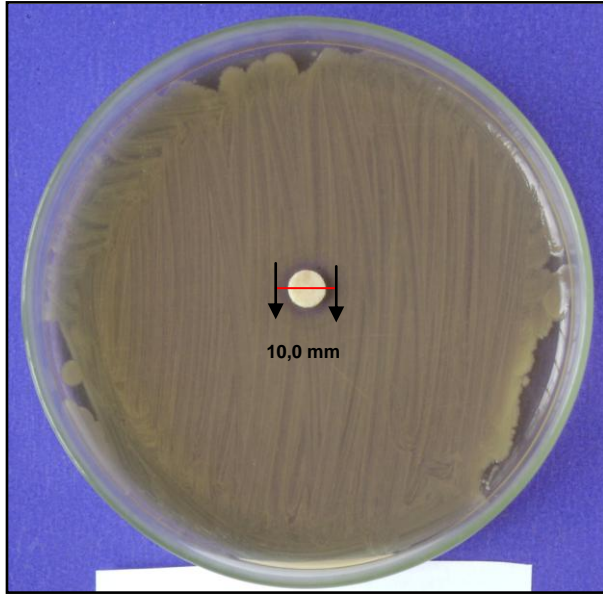
Escherichia coli EPEC O111



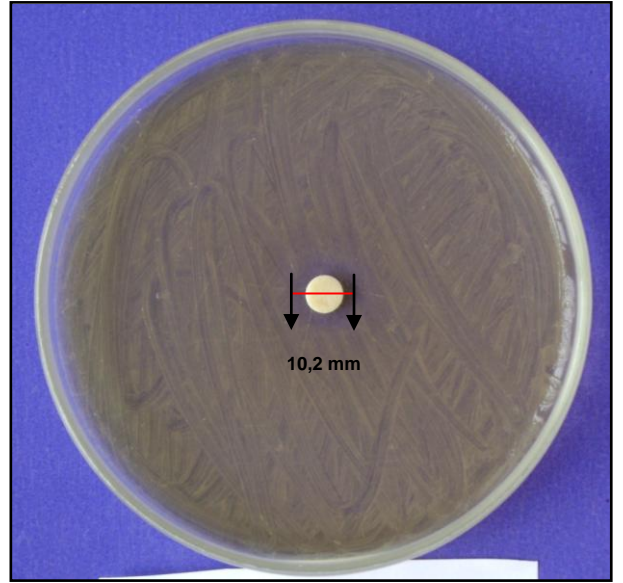
Escherichia coli EPEC O114



Escherichia coli EPEC O125

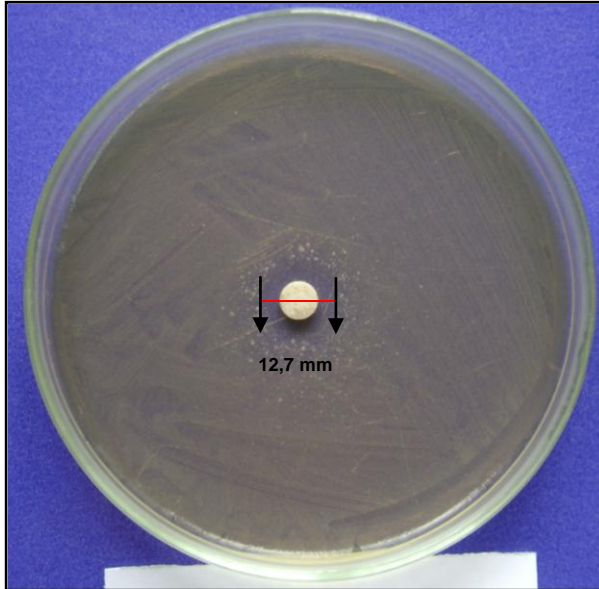


Escherichia coli EPEC O127

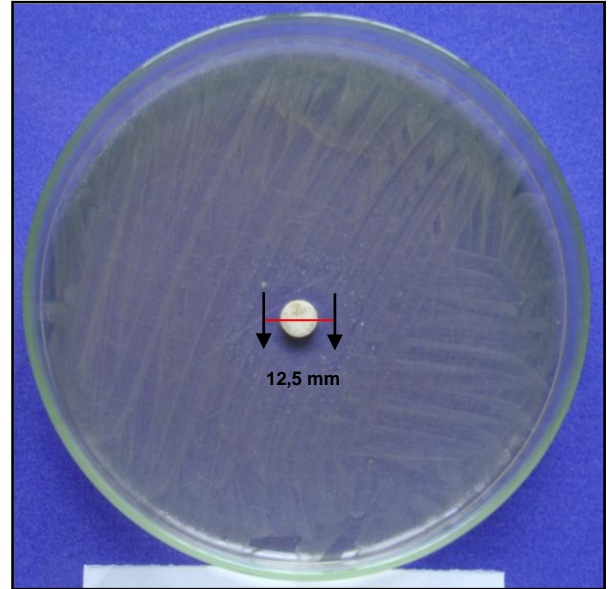


Escherichia coli EPEC O142

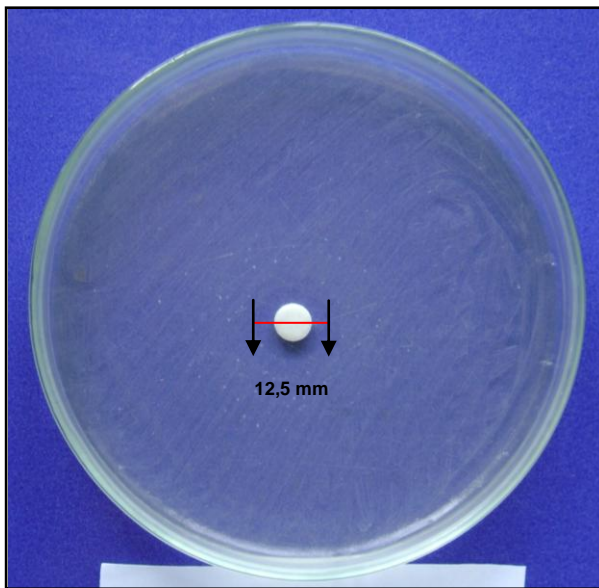
APÊNDICE H. Halos de inibição resultantes da ação antibacteriana do óleo essencial de manjericão (*Ocimum basilicum* Linn.) frente aos sorogrupos de *Escherichia coli* EPEC isoladas das amostras de agrião cultivado pelo sistema orgânico.



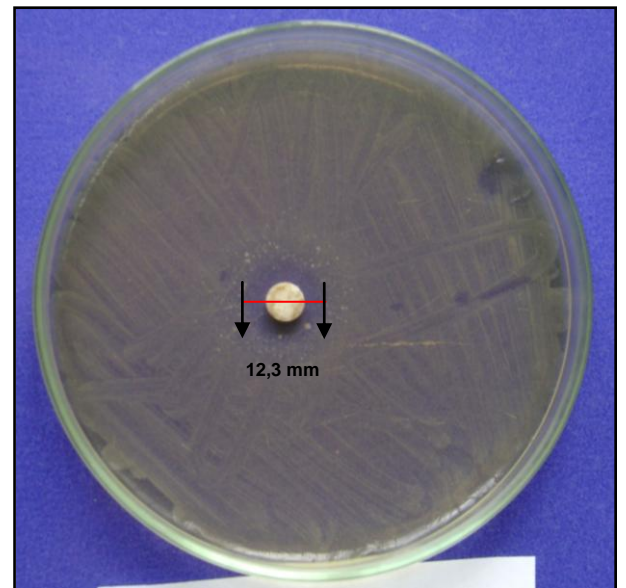
Escherichia coli EPEC O55



Escherichia coli EPEC O125

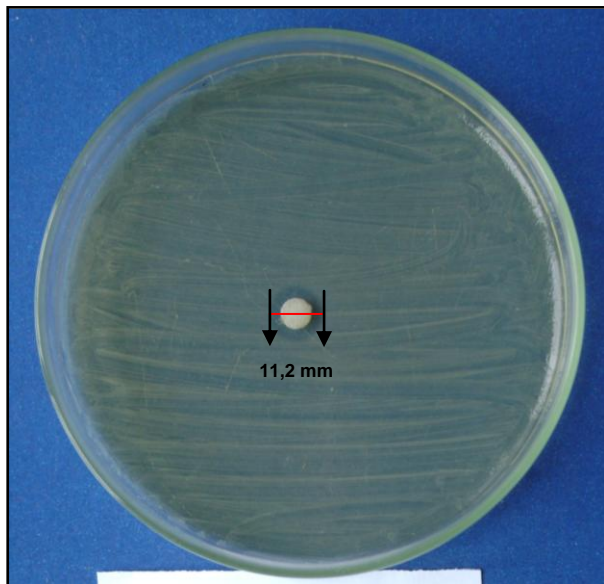


Escherichia coli EPEC O126

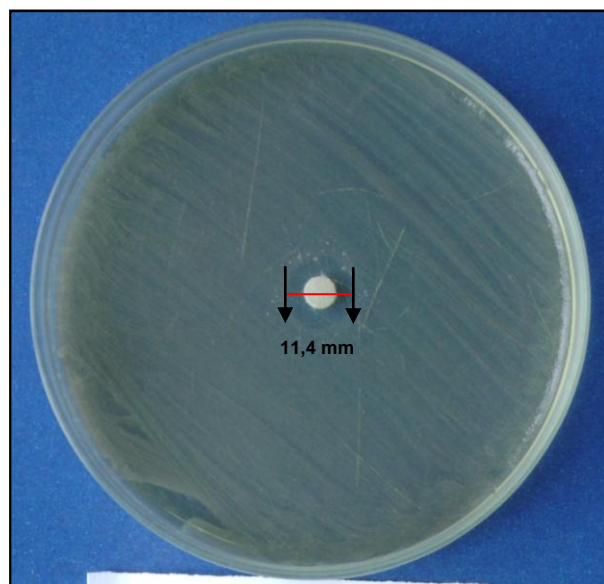


Escherichia coli EPEC O127

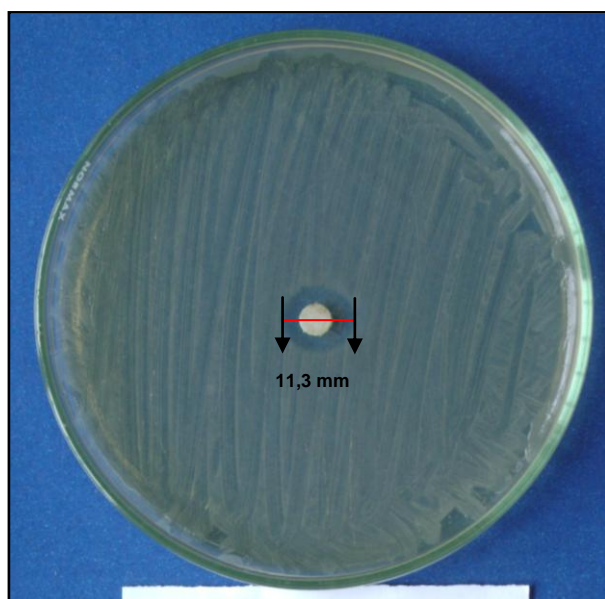
APÊNDICE I. Halos de inibição resultantes da ação antibacteriana do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* Linn.) frente aos sorogrupos de *Escherichia coli* EPEC isoladas das amostras de agrião cultivado pelo sistema hidropônico.



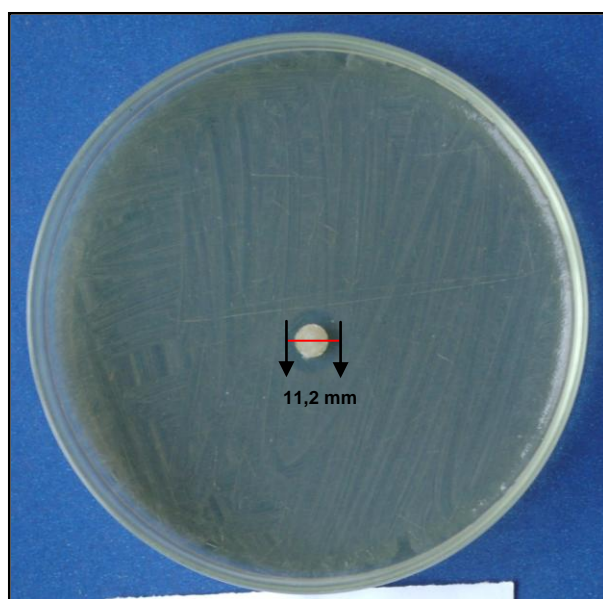
Escherichia coli EPEC O55



Escherichia coli EPEC O125

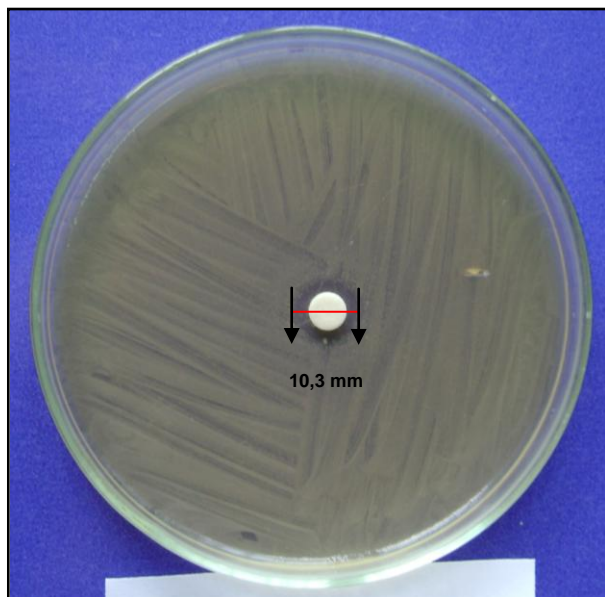


Escherichia coli EPEC O126

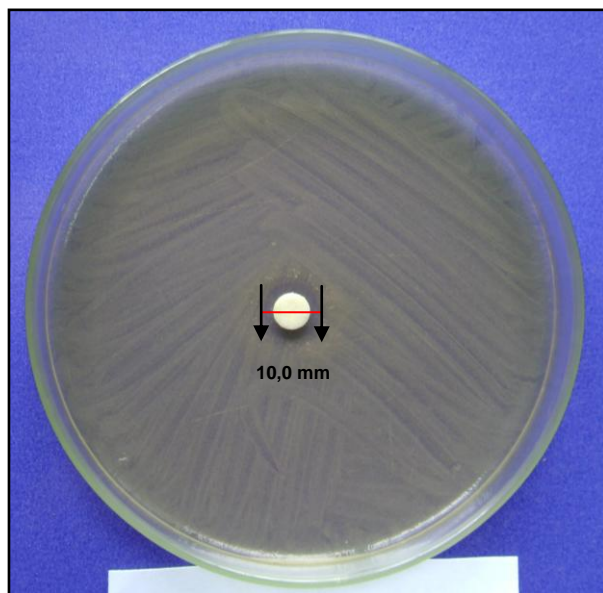


Escherichia coli EPEC O127

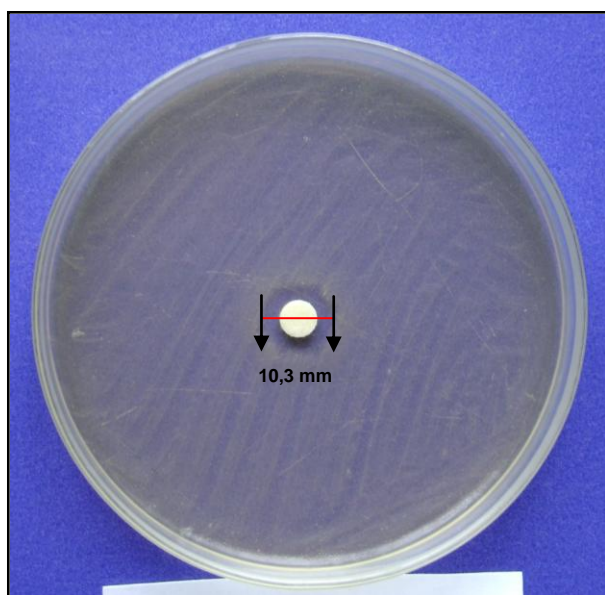
APÊNDICE J. Halos de inibição resultantes da ação antibacteriana do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente aos sorogrupos de *Escherichia coli* EPEC isoladas das amostras de agrião cultivado pelo sistema orgânico.



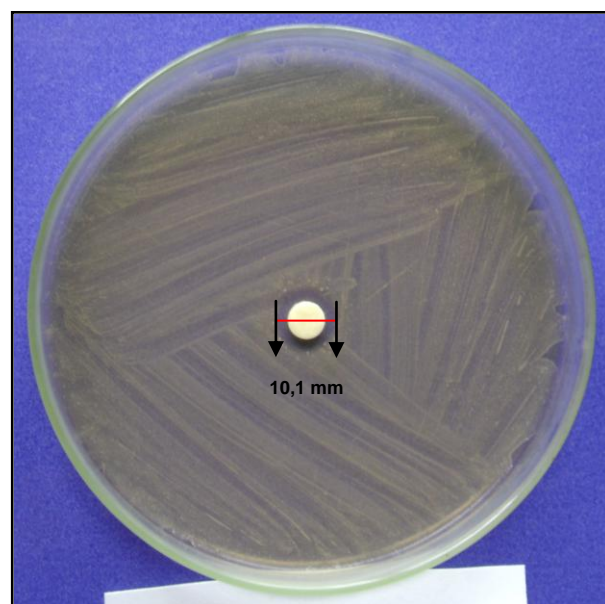
Escherichia coli EPEC O55



Escherichia coli EPEC O125

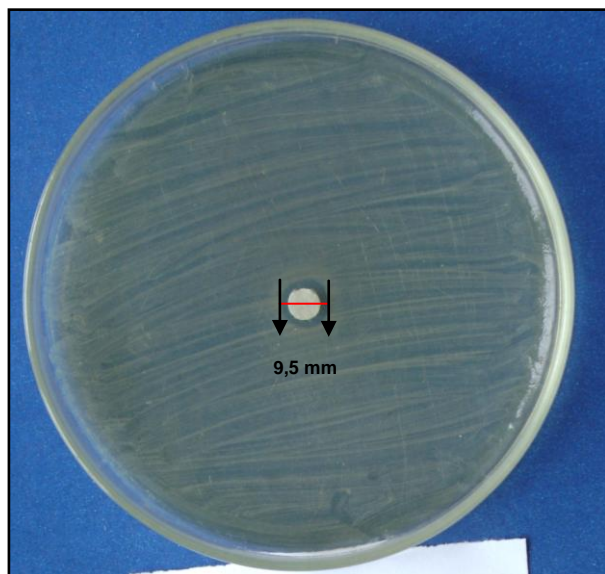


Escherichia coli EPEC O126

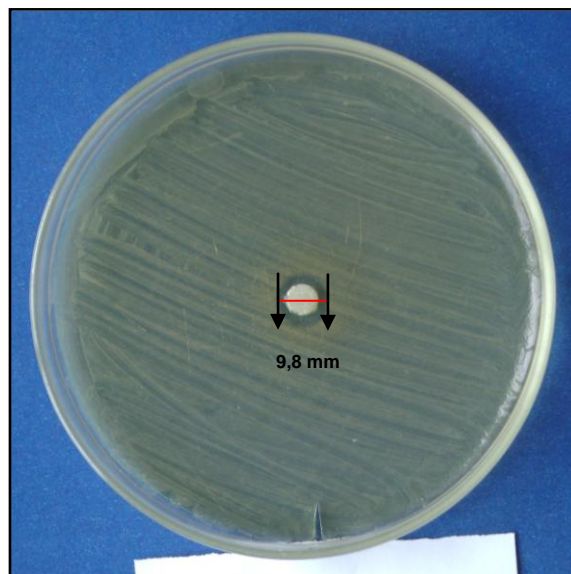


Escherichia coli EPEC O127

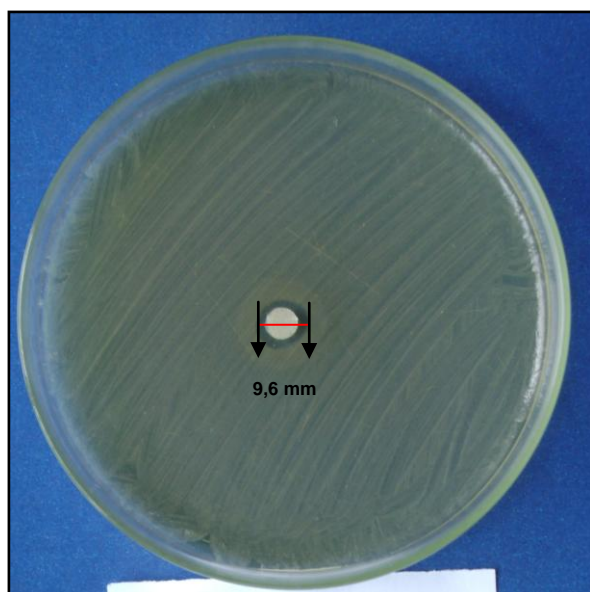
APÊNDICE L. Halos de inibição resultantes da ação antibacteriana do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente aos sorogrupos de *Escherichia coli* EPEC isoladas das amostras de agrião cultivado pelo sistema hidropônico.



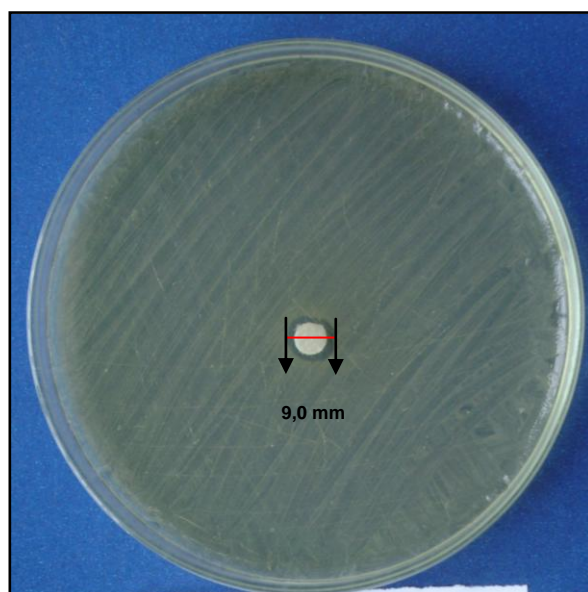
Escherichia coli EPEC O55



Escherichia coli EPEC O125



Escherichia coli EPEC O126



Escherichia coli EPEC O127

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)